



**Universidade de Santiago de Compostela**

Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía  
Instituto de Investigacións e Análisis Alimentarios  
Laboratorio de Parasitoloxía

**“Estudio de enzimas clave en el metabolismo energético del  
ciliado parásito del rodaballo *Philasterides dicentrarchi*:  
¿posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos  
frente a la escuticociliatosis?”**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biología por:

**Natalia Mallo Seijas**

Santiago de Compostela, septiembre de 2015

**José Manuel Leiro Vidal**, Catedrático de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela y **Jesús Lamas Fernández**, Profesor Titular del Área de Biología Celular, del Departamento de Biología Celular y Ecología de la Universidad de Santiago de Compostela

**Certifican:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada: **“Estudio de enzimas clave en el metabolismo energético del ciliado parásito del rodaballo, *Philasterides dicentrarchi*: ¿posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos frente a la escuticociliatosis?”** que, para optar al grado de Doctora en Biología, presenta Doña **Natalia Mallo Seijas**, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología del Instituto de Investigaciones y Análisis Alimentarios bajo nuestra dirección y que, considerándola concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, septiembre de 2015

Fdo: José Manuel Leiro Vidal

Fdo: Jesús Lamas Fernández

Fdo: Natalia Mallo Seijas

Los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados o están pendientes de publicación, en los siguientes artículos de investigación:

Mallo, N., Lamas, J., Leiro, J. (2013). Evidence of an alternative oxidase pathway for mitochondrial respiration in the scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi*. *Protist*, **164**: 824-836.

Mallo, N., Lamas, J., Leiro, J. (2014). Alternative oxidase inhibitors as anti-parasitic agents against scuticociliatosis. *Parasitology*, **141**(10): 1311-1321.

Mallo, N., Lamas, J., Piazzón, C, Leiro, J. (2015). Presence of a plant-like proton-translocating pyrophosphatase in a scuticociliate parasite and its role as a possible drug target. *Parasitology*, **142**(3):449-62.

Mallo, N., Lamas, J., de Felipe, A.P., de Castro, M.E., Sueiro, R.A., Leiro, J.M. Characterization and physiological role of an isoform of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase located in the alveolar sacs of a scuticociliate parasite (*enviado a Journal of Eukaryotic Microbiology el 28/07/15*).

Mallo, N., Lamas, J., de Felipe, A.P., Sueiro, R.A., Fontenla F., Leiro, J. Regulation of intracellular pH in a histiophagous scuticociliate parasite of turbot and its physiological transcendence (*pendiente de ser enviado*).

Mallo, N., Lamas, J., de Felipe, A.P., Sueiro, R.A., Fontenla F., Leiro, J. Pyrophosphate and calcium metabolism enzymes as chemotherapeutic targets against turbot scuticociliatosis (*pendiente de ser enviado*).

*A mi familia*



“La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando.”

Pablo Picasso



Me gustaría expresar mi gratitud a los profesores José Manuel Leiro Vidal y Jesús Lamas Fernández, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, y cuya experiencia, apoyo, paciencia y dedicación han sido fundamentales para que se llevase a cabo.

Por otra parte, quería agradecer su colaboración a M<sup>a</sup> Eugenia de Castro y M<sup>a</sup> Isabel González Siso del Departamento de Biología Celular y Molecular de Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

También me gustaría dar las gracias por su ayuda a todos los compañeros que he tenido durante estos años; a Belén, Raquel, Fany, Laura y Manolo, por sus ánimos, a Mónica, Jonal, Patri, Pedro, Marcela, Silvana, Tania, Berta, Nuria, Iria, Eva, Fran, Vero y Sergio, con los que he pasado muy buenos ratos y de los que he aprendido mucho, sobre todo de Carla, a la que he freído a preguntas en su día con mis ya clásicos “berenjenales”, y a Rosa Ana, Eva y Paula, en las que además me he apoyado mucho en la última etapa de escritura. Muchas gracias por vuestra ayuda y vuestros ánimos, como soy un “toxiño” no voy a dejar aquí escrito nada emotivo con lo que luego me podáis vacilar...

Especialmente, quiero agradecer a mi familia el apoyo sin el cual me habría sido imposible llegar al finalizar este trabajo. Y a los que no sois mi familia pero como si lo fueseis: calabazas, os llevo en el corazón.

La realización de la presente memoria de Tesis Doctoral ha sido posible gracias al aporte económico recibido a través de subvenciones concedidas por diversos organismos públicos y privados y que se relacionan a continuación:

## PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN CONVOCATORIAS COMPETITIVAS

### ***1. IMPROVEMENT OF AQUACULTURE PRODUCTION BY THE USE OF BIOTECHNOLOGICAL TOOLS. (MEJORA DE LA PRODUCCIÓN EN ACUICULTURA MEDIANTE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA)***

(*AQUAGENOMICS*). Ayudas de financiación estratégica de programas de actividad investigadora efectuadas por equipos de investigación de alto nivel, en el marco del Programa Consolider-Ingenio 2010. Convocatoria 2007. Ministerio de Educación y Ciencia. Referencia: CSD2007-00002.

2. ***CONTROL Y SEGUIMIENTO DE ENFERMEDADES BACTERIANAS Y PARASITARIAS EN UN SISTEMA DE RECIRCULARIZACIÓN EN ACUICULTURA.*** INCITE-Programas sectoriales de investigación aplicada, PEME+I+D e I+D Suma, de la Xunta de Galicia. Convocatoria de proyectos I+D liderados por empresas privadas. Entidad solicitante: Aquacria S.L. Código 08MMA018E.
3. ***CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA EN ESCUTICOCILIADOS DEL RODABALLO Y BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS PROTECTORES PARA SU DIAGNÓSTICO Y CONTROL.*** Programa Nacional de Proyectos de investigación Fundamental, VI Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011. Ministerio de Ciencia e Innovación. Código del Proyecto: AGL2010-21219.
4. ***ADVANCED TOOLS AND RESEARCH STRATEGIES FOR PARASITE CONTROL IN EUROPEAN FARMED FISH. PARAFISHCONTROL.*** Strategic objective: SFS-10a-2014 –Scientific basis and tools for preventing and mitigating parasitic diseases of European farmed fish. Horizon 2020 – Research and Innovation Framework Programme. Proposal number: 634429-2.
5. ***DISEÑO Y ELABORACIÓN DE NUEVAS VACUNAS QUE PERMITAN UNA MAYOR PROTECCIÓN E INOCUIDAD FRENTE A ESCUTICOCILIADOS PARÁSITOS DEL RODABALLO.*** Proyecto I+D+i, Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, Convocatoria 2014. Ministerio de Economía y Competitividad. Referencia: AGL2014-57125-R.

AYUDAS A PROGRAMAS DE CONSOLIDACIÓN Y  
ESTRUCTURACIÓN DE UNIDADES DE INVESTIGACIÓN  
COMPETITIVAS DEL SISTEMA UNIVERSITARIO DE GALICIA (SUG):

*SOLICITANTE:* JOSÉ BLANCO MÉNDEZ

*MODALIDAD:* GRUPOS CON POTENCIAL DE CRECIMIENTO (GPC)

*Nº EXPEDIENTE:* GPC2014/069

*INICIO-FIN:* 2014-2016

*ENTIDAD SUBVENCIONADORA:* CONSEJERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN Y ORDENACIÓN UNIVERSITARIA. DIRECCIÓN GENERAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DEL SISTEMA UNIVERSITARIO DE GALICIA (XUNTA DE GALICIA). PROGRAMA DE CONSOLIDACIÓN Y ESTRUCTURACIÓN DE UNIDADES DE INVESTIGACIÓN COMPETITIVAS.

## AYUDA DE FORMACIÓN DE PERSONAL INVESTIGADOR

Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I+ D + i del Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2011-043910), asociada al proyecto: Caracterización de la variación intraespecífica en escuticociliados del rodaballo y búsqueda de antígenos protectores para su diagnóstico y control (AGL2010-21219).



**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**ADP:** adenosín difosfato

**AMA:** antimicina A

**AMDP:** aminometilendifosfonato

**Aminoácido:** aa

**AOX:** oxidasa alternativa

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ARNr:** ácido ribonucleico ribosómico

**ART:** artemisinina

**ATP:** adenosín trifosfato

**BALB/c:** línea de ratones *Bagg Albino*

**BSA:** seroalbúmina bovina

**CM -TRP:** medio completo sin triptófano

**COL:** colaboradores

**COX:** citocromo c oxidasa

**CQ:** cloroquina

**CTE:** cadena de transporte de electrones

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DIG:** digitonina

**DMSO:** dimetilsulfóxido

## Abreviaturas

**dNTP:** desoxinucleótidos trifosfato

**DPBS:** tampón fosfato salino Dulbecco.

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EGTA:** ácido etilenglicoltetraacético

**ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay*

**FADH<sub>2</sub>:** Flavín adenín deshidrogenasa

**FBS:** suero fetal bovino

**FCA:** Adyuvante completo de Freund

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**G:** glutamato

**IC50:** concentración inhibitoria que provoca el 50% de la mortalidad.

**ICR/CD-1:** línea de ratones, *Institute for Cancer Research Caesarian Derived-1*

**Ig:** inmunoglobulina

**HBSS:** solución salina balanceada de Hanks.

**HRP:** Peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)

**Hsp70:** proteínas de choque térmico 70

**IPTG:** isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

**KCN:** cianuro potásico

**kDa:** kiloDaltons

**KLH:** *Keyhole Lympet Hemocyanin*

**L- 15:** Medio de cultivo Leivobitz -15

**LB:** Luria Broth

**MAP:** Antígeno enriquecido en proteínas de membrana de *P. dicentrarchi*

**MIQUE:** *Minimum Information for Publication Quantitative Real-Time PCR Experiments*

**MMLV-RT:** *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

**NADH:** Nicotin adenin deshidrogenasa

**NJ:** método del vecino más próximo (*Neighbour-Joining*)

**OD:** densidad óptica

**OPD:** ortofenilendiamina

**ORF:** *Open Reading Frame*

**PAM:** pamidronato sódico

**pb:** pares de bases

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PG:** propilgalato

**Piph:** gen de la pirofosfatasa translocadora de protones de *P. dicentrarchi*.

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PPasa:** pirofosfatasa

**PVDF:** polifluoruro de vinilideno

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RACE:** *Rapid Amplification of cDNA Ends*.

**RE:** retículo endoplasmático

**RESV:** resveratrol

**RIS:** risedronato sódico

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

## Abreviaturas

**S:** succinato

**SDS:** dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato sódico

**SHAM:** ácido salicilhidroxámico

**SMCC:** (succinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato), 5

**SNC:** Suero Normal de cabra

**SOD:** Superóxido dismutasa

**SSF:** solución salina fisiológica

**SSUrRNA:** gen que codifica al ARN ribosómico de la subunidad pequeña

**TAE:** tampón TRIS acetato EDTA

**TBE:** tampón TRIS borato EDTA

**TBS:** tampón TRIS salino

**TBS-T:** tampón TBS con 0,2% Tween 20

**TEM:** microcopía electrónica de transmisión.

**TM:** temperatura de *melting*

**TRIS:** tris(hidroximetil)aminometano

**TS:** Tampón Sörensen

**Tub:** gen de la tubulina de *P. dicentrarchi*

**YNB:** *Yeast nitrogen base*

**YPHSM:** *Yeast Peptone High Stability Expression Medium*

**$\Delta\Psi_m$ :** potencial de membrana

## Resumo

A escuticociliatose do rodaballo en cultivo, producida polo ciliado *Philasterides dicentrarchi*, é unha enfermidade parasitaria que provoca grandes perdas económicas no sector e para a cal non se dispón de medidas efectivas de control. Neste traballo, estudáronse diferentes enzimas implicadas no metabolismo enerxético do parasito, que poderían actuar como dianas terapéuticas, así como posibles tratamentos que actúen a nivel destas. En primeiro lugar, estudouse o funcionamento da respiración mitocondrial do escuticociliado, revelándose a existencia dunha ruta alternativa na que está presente unha oxidasa alternativa e cuxos inhibidores afectan ao crecemento do ciliado, polo que se propón o emprego dos inhibidores antioxidantes non tóxicos, propilgalato e resveratrol, como tratamentos fronte á escuticociliatose e se formula esta enzima como unha diana quimioterapéutica interesante, tendo en conta a súa ausencia no hospedador. Por outra parte, realizouse a caracterización dunha pirofosfatasa inorgánica translocadora de protóns que presenta dúas isoformas, xeradas mediante un proceso de corte e empalme alternativo, que se localizan nas membranas de vacuolas citoplasmáticas e sacos alveolares, estruturas acídicas relacionadas con procesos de osmorregulación, as cales se mostran como estruturas tipo acidocalcisoma, xa que funcionan ademais como almacén de  $\text{Ca}^{+2}$ . Observouse que fármacos antimaláricos, como a cloroquina e a artemisinina, e análogos do pirofosfato presentan actividade antiparasitaria relacionada co seu efecto sobre enzimas do metabolismo do PPI e do  $\text{Ca}^{+2}$ , a pirofosfatasa inorgánica translocadora de protóns e a  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa. Estas enzimas participan na homeostase do pH intracelular e do  $\text{Ca}^{+2}$ , mecanismos vitais para a supervivencia do parasito, o que demostra que as pirofosfatasas tamén son moléculas diana clave para o desenvolvemento de novos fármacos fronte á escuticociliatose.

## Palabras chave

Oxidasa alternativa, Pirofosfatasa inorgánica, *P. dicentrarchi*, bifosfonatos, antioxidantes.

## Resumen

La escuticociliatosis del rodaballo en cultivo, producida por el ciliado *Philasterides dicentrarchi*, es una enfermedad parasitaria que provoca grandes pérdidas económicas en el sector y para la cual no se dispone de medidas



efectivas de control. En este trabajo, se han estudiado diferentes enzimas implicadas en el metabolismo energético del parásito, que podrían actuar como dianas terapéuticas, así como posibles tratamientos que actúen a nivel de éstas. En primer lugar, se estudió el funcionamiento de la respiración mitocondrial del escuticociliado, revelándose la existencia de una ruta alternativa en la que está presente una oxidasa alternativa y cuyos inhibidores afectan al crecimiento del ciliado, por lo que se propone el empleo de los inhibidores antioxidantes no tóxicos, propilgalato y resveratrol, como tratamientos frente a la escuticociliatosis y se plantea esta enzima como una diana quimioterapéutica interesante, teniendo en cuenta su ausencia en el hospedador. Por otra parte, se realizó la caracterización de una pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones que presenta dos isoformas, generadas mediante un proceso de corte y empalme alternativo, que se localizan en las membranas de vacuolas citoplasmáticas y sacos alveolares, estructuras acídicas relacionadas con procesos de osmorregulación, las cuales se muestran como estructuras tipo acidocalcisoma, ya que funcionan además como almacén de  $\text{Ca}^{+2}$ . Se ha observado que fármacos antimaláricos, como la cloroquina y la artemisinina, y análogos del pirofosfato presentan actividad antiparasitaria relacionada con su efecto sobre enzimas del metabolismo del  $\text{PPi}$  y del  $\text{Ca}^{+2}$ , la pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones y la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa. Estas enzimas participan en la homeostasis del pH intracelular y del  $\text{Ca}^{+2}$ , mecanismos vitales para la supervivencia del parásito, lo que demuestra que las pirofosfatasas también son moléculas diana clave para el desarrollo de nuevos fármacos frente a la escuticociliatosis.

### **Palabras clave**

Oxidasa alternativa, Pirofosfatasa inorgánica, *P. dicentrarchi*, bifosfonatos, antioxidantes.

### **Abstract**

Scuticociliatosis of cultured turbot, produced by the ciliate *Philasterides dicentrarchi*, is a parasitic disease that causes great economic losses in the sector and for which there is not available effective control measures. In this work, we have studied different enzymes involved in energetic metabolism of the parasite, which could act as therapeutic targets and also we have studied possible treatments that act one level of these enzymes. First of all, we studied scuticociliate mitochondrial respiration, revealing the existence of an

alternative path in which is present an alternative oxidase and whose inhibitors whose affect ciliate growth. For that, it's proposed the non toxic antioxidant inhibitors employment, like propyl gallate and resveratrol, as treatments facing scuticociliatosis and this enzyme is formulated as an interesting chemotherapeutic target, due to its absence from the host. On the other hand, we have characterized a proton translocating inorganic pyrophosphatase which has two isoforms generated through an alternative splicing process. Isoforms are located in cytoplasmic vacuoles and alveolar sacks membranes, both acidic structures related with osmoregulation processes, which are shown as acidocalcisome type structures, since they work as well as  $\text{Ca}^{2+}$  stores. It has been observed that antimalarial drugs such as chloroquine and artemisinin, and pyrophosphate analogs have antiparasitic activity related to its effect on PPI and  $\text{Ca}^{2+}$  enzymes metabolism, the proton translocating inorganic pyrophosphatase and the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. These enzymes are involved in the intracellular pH and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, vital mechanisms for parasite survival, demonstrating that the pyrophosphatases are also key target molecules to the development of new drugs against scuticociliatosis.

**Key words**

Alternative oxidase, Inorganic pyrophosphatase, *P. dicentrarchi*, bisphosphonates, antioxidants.

## Índice

### Introducción

<b>1.- Acuicultura</b>	3
1.1.- Acuicultura del rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> L., 1758)	4
1.2.- Hábitat, biología y patología del rodaballo. Enfermedades	5
1.2.1.- <i>Producidas por amebas; enfermedades branquiales amebianas</i>	6
1.2.2.- <i>Producidas por flagelados; costiosis</i>	7
1.2.3.- <i>Producidas por esporozoos; criptosporidiosis</i>	7
1.2.4.- <i>Producidas por microsporidios; microsporidiosis</i>	8
1.2.5.- <i>Producidas por cestodos; infección por Bothriocephalus scorpii</i>	8
1.2.6.- <i>Producidas por mixosporidios; mixosporidiosis</i>	9
1.2.7.- <i>Producidas por ciliados</i>	
1.2.7.1.- <i>Tricodinosis</i>	9
1.2.7.2.- <i>Infección por Cryptocarion</i>	10
1.2.7.3.- <i>Escuticociliatosis</i>	10
<b>2.- Epidemiología y prevención de la escuticociliatosis</b>	11
<b>3.- Diagnóstico y tratamiento de la escuticociliatosis</b>	12
<b>4.- Biología de <i>Philasterides dicentrarchi</i></b>	14
4.1.- Morfología de ciliados: <i>P. dicentrarchi</i>	14
4.2.- Reproducción en ciliados: <i>P. dicentrarchi</i>	17
4.3.- Taxonomía de escuticociliados; <i>P. dicentrarchi</i> .	18
<b>5.- Ecología de ciliados</b>	20
<b>6.- Bioquímica parasitaria: Metabolismo bioenergético en eucariotas y adaptaciones a condiciones de estrés</b>	22
6.1.- Mitocondria: la cadena de transporte electrónico en la respiración mitocondrial	24
6.1.1.- <i>Adaptaciones de la mitocondria y la CTE en parásitos</i>	27
6.2.- Ruta alternativa de la respiración mitocondrial; Oxidasa alternativa	31
6.2.1.- <i>Distribución de la AOX</i>	32
6.2.2.- <i>Estructura y funcionamiento de la AOX</i>	33
6.2.3.- <i>Funciones de la AOX y regulación de su expresión</i>	36
6.3.- Detoxificación de ROS	39
6.4.- Papel de la mitocondria en la muerte celular	41
6.5.- Funciones y regulación del calcio	42

6.5.1.- Regulación de los niveles de $Ca^{+2}$ en los acidocalcisomas y vacuolas	46
6.6.- Ppasas inorgánicas	47
6.6.1.- Clasificación y funcionamiento de las Ppasas	48
6.6.2.- Distribución de las $H^{+}$ -Ppasas	49
6.6.3.- Estructura y regulación de las $H^{+}$ -Ppasas	50
6.6.4.- Localización, funciones de las $H^{+}$ -Ppasas y regulación de su expresión	53
<b>7.- Búsqueda de agentes quimioterapéuticos frente a la escuticociliatosis</b>	55
7.1.- Agentes antioxidantes	55
7.1.1.- Propil galato	56
7.1.2.- Resveratrol	56
7.2.- Análogos del PPI	58
7.3.- Agentes antimaláricos	60
7.3.1.- Artemisinina	60
7.3.2.- Cloroquina	62
<b>Objetivos</b>	65
<b>Material y métodos</b>	69
<b>1.- Animales de experimentación</b>	69
1.1.- Rodaballos	69
1.2.- Ratones	69
1.3.- Ciliados: Bioética	69
<b>2.- Reactivos químicos</b>	70
<b>3.- Técnicas parasitológicas</b>	70
3.1.- Parásitos	70
3.1.1.- Ciliados: Philasterides dicentrarchi. Cultivo e infecciones experimentales	70
3.1.2.- Apicomplejos: Plasmodium berghei. Infecciones experimentales y obtención del parásito	71
3.1.2.1. Tinción de glóbulos rojos	72
3.2.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	72
3.3.- Determinación de la actividad antiparasitaria en los ciliados	73
<b>4.- Técnicas de Biología Molecular</b>	74
4.1.- Purificación de ácidos nucleicos	74
4.2.- Obtención de ADNc	75
4.3.- PCR y RT-PCR	75

4.4.- RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	76
4.5.- RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends)	77
<b>5.- Técnicas inmunológicas</b>	78
5.1- Producción antígenos, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos	78
5.1.1.- Extracción de proteínas totales de <i>P. dicentrarchi</i>	78
5.1.2.- Extracción de proteínas de membrana de <i>P. dicentrarchi</i>	79
5.1.3.- Construcciones plasmídicas para producción de vacunas de ADN.	80
5.1.4.- Producción proteínas recombinantes en vector pET21d	81
5.1.5.- Producción de proteínas recombinantes en levadura	84
5.1.6.- Síntesis péptidica	86
5.1.7.- Determinación de la concentración proteica	87
5.2.- Inmunizaciones y obtención de los sueros policlonales	87
5.2.1.- Inmunización genética	87
5.2.2.- Inmunización con proteínas/péptidos	87
5.2.3.- Obtención del suero	88
5.3.- Inmunoensayos	88
5.3.1.- Determinación de los niveles de anticuerpos en el suero	88
5.3.1.1.- ELISA	88
5.3.2.- Immunoblot / Western blot	89
5.3.2.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	89
5.3.2.2.- Western blot	89
5.3.3.- Inmunohistoquímica	92
5.3.3.1.- Inmunohistoquímica al microscopio óptico	92
5.3.3.2.- Inmunohistoquímica al microscopía inmunoelectrónico	93
5.3.4.- Inmunofluorescencia	94
<b>6.- Técnicas bioquímicas</b>	95
6.1.- Técnicas para el estudio de la función mitocondrial	95
6.1.1.- Determinación del consumo de oxígeno mitocondrial	95
6.1.2.- Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )	96
6.2.- Actividad translocadora de $H^+$ dependiente de pirofosfato	97
6.3.- Técnicas de análisis del pH intracelular: tinciones fluorescentes con colorantes sensibles al pH	100

6.4.- Determinación del calcio intracelular	100
6.5.- Determinación de los niveles de PPI	101
<b>7.- Análisis filogenéticos, bioinformáticos y estadísticos</b>	102
7.1.- Análisis filogenéticos	102
7.2.-Análisis Bioinformático	103
7.3.- Análisis estadístico	104
<b>Resultados</b>	107
<b>1.- Estudio de la existencia de una oxidasa alternativa (AOX) en la respiración mitocondrial de <i>P. dicentrarchi</i> y su modulación</b>	107
1.1- Crecimiento in vitro de <i>P. dicentrarchi</i> bajo condiciones de normoxia e hipoxia	107
1.2.- Presencia de una ruta alternativa de la respiración mitocondrial en <i>P. dicentrarchi</i>	108
1.3.- Efecto antiparasitario del SHAM en condiciones de normoxia e hipoxia	109
1.4.- Identificación inmunoquímica de una AOX insensible al cianuro en <i>P. dicentrarchi</i>	111
1.5.- Efecto de los inhibidores de cadena de respiración mitocondrial en la expresión de la AOX en <i>P. dicentrarchi</i>	112
1.6.- Consumo de O <sub>2</sub> y expresión de la AOX después de una infección de <i>P. dicentrarchi</i> en rodaballo	113
1.7.- Consumo de oxígeno y nivel de expresión de la AOX durante el cultivo in vitro de <i>P. dicentrarchi</i>	114
<b>2.- Inhibidores de la oxidasa alternativa como agentes anti-parasitarios frente a la escuticociliatosis</b>	117
2.1.- Efecto de los antioxidantes propilgalato y resveratrol en la respiración del ciliado	117
2.2.- Efecto del PG en la expresión de la AOX	119
2.3.- Efecto antiparasitario de PG y AMA en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>P. dicentrarchi</i>	119
2.4.- Efecto de los antioxidantes PG y RESV en la expresión de la AOX	122
2.5.- Efecto de los antioxidantes en el potencial de membrana mitocondrial	122
2.6.- Efecto de los antioxidantes en la expresión de chaperonas Hsp70	123
2.7.- Expresión de la AOX en diferentes cepas de <i>P. dicentrarchi</i>	125

<b>3.- Estudio de la existencia de una H<sup>+</sup>-PPasa en <i>P. dicentrarchi</i> y su función como posible diana quimioterapéutica</b>	126
3.1.- Identificación de ADNc que codifica para una pirofosfatasa en <i>P. dicentrarchi</i>	126
3.2.- Caracterización de la H <sup>+</sup> -PPasa de <i>P. dicentrarchi</i>	127
3.3.- Análisis filogenético de la H <sup>+</sup> -PPasa de <i>P. dicentrarchi</i>	131
3.4.- Caracterización bioquímica de la H <sup>+</sup> -PPasa en <i>P. dicentrarchi</i>	133
3.5.- Localización subcelular de la H <sup>+</sup> -PPasa en <i>P. dicentrarchi</i>	135
3.6.- Efecto del NaF y los bisfosfonatos en la translocación de H <sup>+</sup> dependiente de PPi y expresión génica	136
<b>4.- Caracterización y papel fisiológico de una isoforma de la H<sup>+</sup>-PPasa localizada en los sacos alveolares de <i>P. dicentrarchi</i></b>	138
4.1.- Características de la secuencia de las isoformas de la H <sup>+</sup> -PPasa	138
4.2.- Marcaje inmunohistoquímico de la H <sup>+</sup> -PPasa con el anticuerpo policlonal (PAB <sub>HK</sub> )	140
4.3.- Inmunolocalización celular de la H <sup>+</sup> -PPasa de <i>P. dicentrarchi</i> en compartimentos ácidos	141
4.4.- Análisis filogenético de la H <sup>+</sup> -PPasa en 7 aislados de <i>P. dicentrarchi</i>	143
4.5.- Efecto de la concentración de NaCl en la expresión de la H <sup>+</sup> -PPasa	144
<b>5.- Modulación del pH intracelular en <i>P. dicentrarchi</i> en diferentes condiciones fisiológicas</b>	145
5.1.- Presencia de calcio en orgánulos ácidos en <i>P. dicentrarchi</i>	145
5.2.- Efecto del ATP en la actividad translocadora de protones	148
5.3.- Efecto del calcio en la actividad translocadora de protones	150
5.4.- Influencia del calcio y el ATP en la expresión génica de la H <sup>+</sup> -PPasa	152
5.5.- Efecto del calcio y el ATP en la expresión proteica de la H <sup>+</sup> -PPasa	152
5.6.- Efecto de la salinidad sobre la actividad translocadora de protones	153
5.7.- Efecto de la salinidad sobre los niveles de calcio intracelular	155



<b>6.- Enzimas del metabolismo del pirofosfato y del calcio como agentes quimioterapéuticos frente a la escuticociliatosis</b>	156
6.1.- Antimaláricos	156
6.1.1.- <i>Efecto de antimaláricos sobre el crecimiento del ciliado</i>	156
6.1.2.- <i>Efecto de los antimaláricos sobre la acidificación celular</i>	157
6.1.3.- <i>Efecto de los antimaláricos sobre la expresión de la <math>H^+</math>-PPasa</i>	159
6.1.4.- <i>Efecto de los antimaláricos y los bisfosfonatos en los niveles de pirofosfato</i>	160
6.2.- Efecto de los bisfosfonatos	162
6.2.1.- <i>Efecto antiparasitario de los bisfosfonatos</i>	162
6.2.2.- <i>Efecto de los bisfosfonatos sobre la actividad translocadora de <math>H^+</math> de la <math>H^+</math>-PPasa de <i>P. dicentrarchi</i></i>	163
6.2.3.- <i>Efecto de los bisfosfonatos sobre la expresión génica de la <math>H^+</math>-PPasa</i>	163
6.2.4.- <i>Efecto del RIS, sobre los niveles de calcio intracelular</i>	164
<b>Discusión</b>	169
<b>Conclusiones</b>	209
<b>Bibliografía</b>	215



# *Introducción*

---



## 1.- Acuicultura

Bajo el término “acuicultura” se entienden todas las actividades relacionadas con el cultivo de especies acuáticas. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (F.A.O.), se define la acuicultura como: el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y algas, lo cual implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación, la protección frente a depredadores, etc.

La acuicultura se ha venido practicando desde hace 4000 años. En la antigüedad, la piscicultura surgió como una forma de mantener vivas las especies capturadas hasta su posterior venta (en China, la carpa; en Egipto, la tilapia, etc.) (Rueda González, 2011), sin embargo, la acuicultura ha sufrido sus mayores avances en los últimos 50 años, pasando de dedicarse exclusivamente al engorde, a la cría. Esto sucedió cuando se llegó al estancamiento de la capacidad máxima de la pesca extractiva, de 86,4 millones de toneladas en el año 1996, año en que alcanzó su máximo de producción, según datos de la F.A.O., y a partir de ahí ha ido descendiendo debido a que la mayoría de las especies se encontraban explotadas a un nivel biológicamente insostenible. A partir de ese momento, se ha visto forzada la introducción de nuevas tecnologías para obtener un mayor rendimiento y poder abastecer el mercado, es por ello que presenta un papel esencial en el futuro, como complemento a la pesca. En la actualidad, según el último informe de la F.A.O., la acuicultura representa alrededor del 50% de la procedencia del pescado consumido a nivel mundial, debería superar el 50 % del total en 2015 y llegar al 60 % para 2030, (F.A.O. 2014; *European Aquaculture report 2004-2013 European aquaculture production industry* (Feap, 2014).

En concreto, en España, debido a sus características climatológicas y geográficas, existe un gran potencial para estas actividades, por lo que en las últimas décadas se ha experimentado una gran expansión del sector. Galicia, especialmente, debido a la gran cantidad de costa que posee, se ha convertido en un lugar idóneo para desarrollo de actividades acuícolas que además tienen gran potencialidad, ya que a diferencia de la ganadería, las tasas de reproducción de los peces son muchísimo más altas.

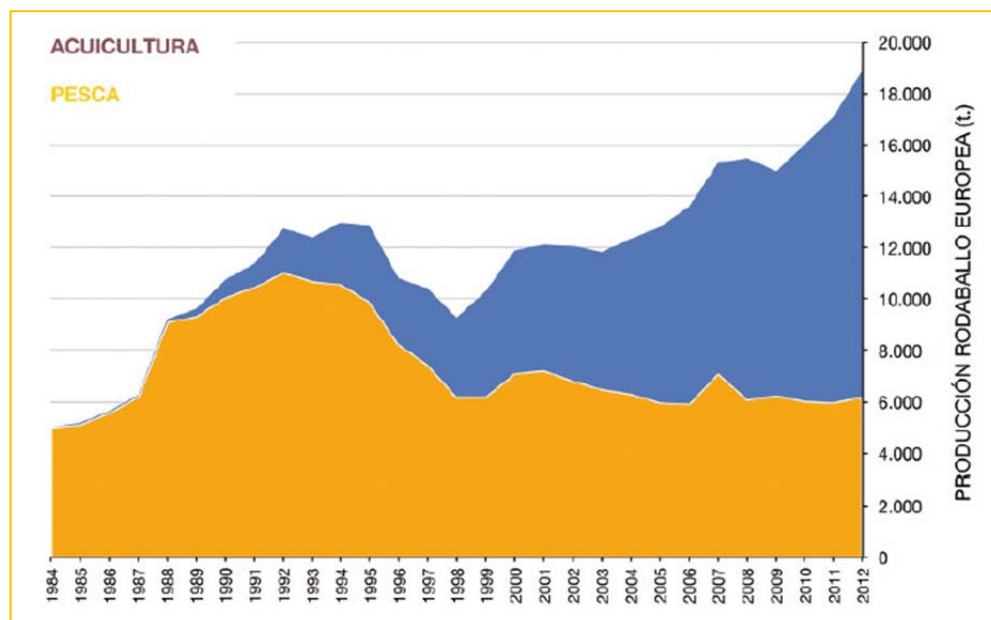
La producción mundial en el sector de la acuicultura sigue en crecimiento, aunque en menor medida. Según las últimas estadísticas de la F.A.O., a nivel mundial, la acuicultura alcanzó un máximo histórico en el año 2012 con 90,4 millones de toneladas, de los cuales 66,6 millones correspondieron a peces.

Entre los retos de la acuicultura moderna se encuentran la disponibilidad de materias primas para los piensos y el desarrollo de nuevos avances tecnológicos que permitan un mayor control sanitario y una mayor producción sin la destrucción de los ecosistemas. Dentro de las finalidades de la acuicultura, aparte de abastecer el mercado alimenticio, se engloban también la suelta de ejemplares para repoblación en su medio natural, la producción de fármacos y la investigación científica (F.A.O., 2014).

### **1.1.- Acuicultura del rodaballo, *Scophthalmus maximus*, (Linnaeus, 1758)**

La acuicultura del rodaballo comenzó a desarrollarse en los años 70 en Escocia, desenvolviéndose poco después en España y primordialmente en Galicia. Actualmente se cultiva en gran parte de Europa y China (Eurostat, Cultivo de rodaballo en Europa, Comisión Europea, 2012; Fernández-Casal y col., 2008). La cantidad de rodaballo salvaje capturado con respecto a la producción total es cada vez menor, siendo en la actualidad mayor el

abastecimiento de esta especie por parte de la producción acuícola que por la pesca (fig. 1, F.A.O. 2014).



**Figura 1:** Evolución de la producción europea (t.) de rodaballo (*Scophthalmus maximus*), mediante acuicultura y pesca durante el periodo 1980-2012 (F.A.O. 2014).

La producción de rodaballo en Europa a través de la acuicultura fue de 7.721 t en el año 2013, de las cuales, el 88,3% procedían de España, un 38,1% menos que en el año 2012, y de estas, el 99% procedieron de Galicia, en donde se generan prácticamente la totalidad de los alevines (Informe: La Acuicultura en España 2014, Asociación Empresarial de Productores de Cultivos marinos en España, A.P.R.O.M.A.R.). A nivel mundial, el mayor productor de rodaballo es China, según datos de la F.A.O., aunque no se asegura que la especie de cultivo sea exactamente la misma.

## 1.2.- Hábitat, biología y patología del rodaballo

El rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Linneus, 1758), es un pez marino ubicado dentro de la Clase Actinopterygii, División Teleostei, Orden Pleuronectiformes y Familia Scophthalmidae. Se trata de un pez bentónico

que, en su hábitat natural, reside en fondos arenosos y fangosos de 20 a 70 metros de profundidad. Su distribución llega desde el Mar Báltico hasta el Atlántico nororiental en la zona de Marruecos, el Mar Mediterráneo y el Mar Negro. Su cuerpo aplanado es romboide y asimétrico en los adultos, posee los ojos en el lado izquierdo y una mandíbula grande y prominente. Su pigmentación, únicamente en la cara cenital, es críptica, imitando el color del sustrato para mimetizarse, yendo desde el color pardo al grisáceo. No posee escamas pero sí tiene tubérculos óseos en el dorso que le aportan una ligera rugosidad en la piel y la aleta caudal es homocerca. Alcanza su madurez sexual al quinto año de vida y no presenta diferenciación sexual externa. Desova en primavera y es una especie carnívora, alimentándose de moluscos, crustáceos, peces, cefalópodos, etc. (Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (J.A.C.U.M.A.R.), 2006; Fernández-Casal y col., 2008 A.P.R.O.M.A.R., 2014; Martínez González, 2014; F.A.O. 2014).

Debido a las altas densidades de cultivo en los tanques de engorde, además de otros factores relacionados con el estado sanitario de los peces como por ejemplo un mayor sometimiento al estrés debido al confinamiento a altas densidades en espacios reducidos, diferencias nutricionales y posibles problemas con la calidad del agua, los mecanismos de defensa del pez pueden verse alterados y favorecer la transmisión de parásitos y otros microorganismos. En los últimos años han aparecido enfermedades de las que en muchos casos no se tienen grandes conocimientos todavía y muchas de ellas suponen grandes pérdidas económicas debido a las altas tasas de mortalidad que presentan. Estas enfermedades pueden poseer diferentes orígenes: viral (como la Encefalopatía producida por especies del género Nodavirus o la Septicemia Hemorrágica Viral, (VHSV)), bacteriano (furunculosis, edwardseliosis, vibriosis) o parasitario. Entre las enfermedades producidas por parásitos, algunos ejemplos de las más comunes son:

1.2.1.- *Producidas por amebas; enfermedades branquiales amebianas*: amebas del género *Paramoeba*. *Paramoeba perurans* causa la enfermedad amebiana branquial (AGD) (Young y col., 2007). Este tipo de infecciones provocan problemas respiratorios debidos a la aparición de hiperplasia epitelial branquial, incremento en el número de células mucosas, fusión lamelar, desarrollo de vesículas interlamelares con amebas, infiltrados inflamatorios, etc. Su diagnóstico puede hacerse por frotis, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o histología y como tratamiento suelen emplearse baños de agua dulce (Dyková y col., 1995; Fiala y Dyková, 2003; Nowak, 2012; Buchmann, 2015).

1.2.2.- *Producidas por flagelados; costiosis*: Originada por *Ichthyobodo necator* (Henneguy, 1883), un flagelado ectoparásito que se caracteriza por poseer dos flagelos de diferente tamaño, que afecta principalmente a piel, aletas y branquias. En rodaballo produce hiperplasia epitelial, hipersecreción de mucus, cambios en la pigmentación, disgregación en las aletas, anorexia, hiperventilación y finalmente, mortalidad por anoxia. Aunque se trata de un parásito ocasional, puede desarrollar grandes mortalidades. El diagnóstico puede llevarse a cabo confirmando la presencia de flagelados en el moco y la superficie branquial al microscopio óptico y mediante PCR (Isaksen y col., 2012). Es susceptible al tratamiento con formalina y agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (Brøderud y Poppe, 1986; Buchmann, 2015).

1.2.3.- *Producidas por esporozoos; criptosporidiosis*: en rodaballo es ocasionada por el esporozoo *Cryptosporidium scophthalmi* (Álvarez-Pellitero y col., 2004), un endoparásito que distorsiona la arquitectura normal de la mucosa, generando vacuolización del epitelio intestinal, provocando atrofia y fusión de las vellosidades intestinales con acortamiento de las microvellosidades, degeneración y descamación de la

mucosa intestinal. En infecciones avanzadas las vacuolas grandes contienen grupos de ooquistes. Aunque no produce altas mortalidades sí que facilita el establecimiento de otras infecciones (Álvarez-Pellitero y col., 2004). El diagnóstico puede realizarse por histología y su transmisión ocurre principalmente a través de heces y agua (Saraiva y col., 2009; Álvarez-Pellitero y col., 2009; Ryan, 2010).

*1.2.4.- Producidas por microsporidios; microsporidiosis:* Provocada por *Tetramicra brevifilum* (Mathews y Mathews, 1980), un parásito intracelular obligado localizado dentro del Orden Microsporidia que se caracteriza por la producción de esporas. Infecta y atrofia el músculo, lo que conlleva alteraciones en la natación. Los peces infectados se caracterizan por poseer un comportamiento anormal, natación errática, largos periodos de inactividad, pérdida de apetito, hipersecreción mucosa, quistes blanquecinos (xenomas) y un crecimiento más lento. Suele producirse en condiciones de hacinamiento (Figueras y col., 1992). Se piensa que la colonización podría comenzar a través de las aletas dorsales, muy irrigadas, y una vez estabilizada la infección, los xenomas se romperían liberando las esporas e invadiendo al resto de tejidos. La identificación se hace en base a las esporas mediante tinción con Giemsa y el diagnóstico se puede realizar por PCR y Real-Time PCR (q-PCR) (Leiro y col., 1999; 2001; Alonso y col., 2013). No existe tratamiento efectivo, siendo lo más adecuado detectar la enfermedad cuanto antes y aislar a los ejemplares afectados.

*1.2.5.- Producidas por cestodos; infección por Bothriocephalus scorpii* (Müller, 1776): Endoparásito perteneciente a los cestodos que posee un ciclo de vida con tres hospedadores; el primero de ellos suele ser un crustáceo, el segundo algún pez del género *Gobius*, y el hospedador final otro pez, como el rodaballo o la solla, por ejemplo. Produce inflamación crónica



del intestino y disminución del crecimiento, pudiendo causar la muerte (Renaud y col., 1984, Sanmartín y col., 1989).

1.2.6.- *Producidas por mixosporidios; mixosporidiosis:* en rodaballo está causada por *Enteromyxum scophthalmi* (Palenzuela y col., 2002), un endoparásito que infecta el intestino y que, en muchos casos, causa una mortalidad de prácticamente el 100%. Los últimos análisis filogenéticos sitúan a los mixozoos dentro del filo Cnidaria (Nesnidal y col., 2013). Este parásito provoca anorexia, anemia, ojos hundidos, presencia de una cresta en el cráneo (síndrome de la cabeza hundida), órganos pálidos, líquido en el intestino, boca y opérculos abiertos, ascitis y hemorragias intestinales. La transmisión se produce a través de las heces y el agua, y en la diseminación en el hospedador está implicada la vía vascular (Palenzuela y col., 2002; Redondo y col., 2004; Quiroga y col., 2006). Su crecimiento y proliferación resulta favorecido por las altas temperaturas y la mala calidad del agua, por lo que es esencial realizar un diagnóstico precoz en el agua antes de que el parásito llegue al pez ya que muy probablemente termine produciéndole la muerte. Su diagnóstico puede realizarse mediante frotis intestinal, histología, *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), inmunohistoquímica o q-PCR (Sitjá-Bobadilla y col., 2004; Piazzón y col., 2012).

1.2.7.- *Producidas por ciliados:*

1.2.7.1.- *Tricodinosis:* Ocasionada por *Trichodina spp.*, un protozoo ciliado ectoparásito que origina lesiones en los epitelios branquiales a través de un disco adhesivo denticulado. Estas lesiones pueden llegar a cronificarse ya que las producen al utilizarlas como sustrato sobre el que se deslizan y sujetan para nutrirse de partículas del agua y bacterias. También se pueden alimentar de células rotas, facilitando el crecimiento de otras bacterias en el pez. El diagnóstico de la tricodinosis puede realizarse mediante frotis de branquias o piel, o a través de histopatología con tinción de Giemsa, por



ejemplo. Para su tratamiento pueden emplearse los baños con formalina o el agua dulce (Pearse y col., 1972; Sanmartín y col., 1991; Buchmann, 2015).

*1.2.7.2- Infección por Cryptocarion:* *Cryptocarion* es un protozoo marino ciliado holotrico, endoparásito obligado, que cuando afecta a la epidermis causa la característica enfermedad del punto blanco. Actualmente se están estudiando tratamientos químicos y vacunas para su empleo frente a esta enfermedad así como nuevos métodos de diagnóstico (Jee y col., 2000; Sun y col., 2006; Buchmann, 2015).

*1.2.7.3.- Escuticociliatosis:* Originada por unas 20 especies de ciliados parásitos histiófagos pertenecientes al filo Ciliophora y al Orden Scuticociliatida (Kim y col., 2004; Harikrishnan y col., 2010b). Entre estas especies destacan *Philasterides dicentrarchi*, Kahl, 1931 (Dragesco y col., 1995; Iglesias y col., 2001), *Uronema nigricans*, Müller, 1786 (Munday y col., 1997), *Uronema marinum*, Dujardin, 1841 (Jee y col., 2001) y *Pseudocohnilembus persalinus*, Evans y Thomson, 1964 (Kim y col., 2004). La escuticociliatosis causa pérdidas económicas muy significativas en la acuicultura.

*Philasterides dicentrarchi*, según algunos autores sinónimo de *Miamiensis avidus*, Thomson y Moewus, 1964 (Jung y col., 2007), es el agente etiológico de esta enfermedad en rodaballo. Este ciliado de vida libre que puede comportarse como un endoparásito del rodaballo, generalmente habita en costas eutróficas y aguas de tanques de cultivos marinos (Harikrishnan y col., 2010b) causando infecciones también en otras especies como la lubina (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) en cultivo (Dragesco y col., 1995; Ramos y col., 2007), el falso halibut (fletán) del Japón (*Paralichthys olivaceus*, Temminck y Schlegel, 1846) (Yoshinaga y Nakazoe, 1993; Kim y col., 2004), los dragones de mar (*Phyllopteryx taeniolatus*, Lacépède, 1804 y *Phycodurus eques*, Günther, 1865) (Umehara y col., 2003;

Rossteuscher y col., 2008), el caballito de mar (*Hippocampus kuda*, Bleeker, 1852 e *Hippocampus abdominalis*, Lesson, 1827) (Shin y col., 2011; Di Cicco y col., 2013) y varias especies de tiburón (tiburón cebrá, *Stegostoma fasciatum*, Hermann, 1783; tiburón de Port Jackson, *Heterodontus portusjacksoni*, F.A.A. Meyer, 1793 y dormilón japonés, *Heterodontus japonicus*, MacLay y W.J. Macleay, 1884 (Stidworthy y col., 2014). También se han encontrado escuticociliados en crustáceos y equinodermos actuando bien como simbiosis o como parásitos (Small y col., 2005; Lynn y col., 2005).

## 2.- Epidemiología y prevención de la escuticociliatosis

*P. dicentrarchi* es un ciliado de vida libre que encontrándose en el agua de los tanques de cultivo, paredes, o en la propia piel de los peces y las branquias, puede llegar a penetrar a través de lesiones y proliferar causando importantes pérdidas económicas en la industria del rodaballo en cultivo (Paramá y col., 2003). Además de las lesiones, se han investigado otras posibles rutas de entrada como la oral, la peri-orbital o la nasal, sin obtener resultados demasiado claros al respecto (Paramá y col., 2003; Jin y col., 2009). Una vez dentro del hospedador, el parásito fluye rápidamente a través de la sangre y el tejido conectivo principalmente, hasta alcanzar diversos órganos del pez, pudiendo llegar a provocarle la muerte (Puig y col., 2007; Moustafa y col., 2010).

Las infecciones producidas por este ciliado ocasionan oscurecimiento de la piel, úlceras profundas, acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, exoftalmia, distrofia y necrosis del músculo, anemia, encefalitis asociada a la licuefacción del tejido cerebral, hemorragias e infecciones sistémicas (Dyková y Figueras, 1994; Dragesco y col., 1995; Iglesias y col., 2001; Harikrishnan y col., 2010b).

Se trata de una de las enfermedades más graves del rodaballo en cultivo y según la Guía para la Gestión Sanitaria en Acuicultura (Rodgers y Furones, 2011), se clasifica como un parásito de riesgo 2, regional-marino, que afecta principalmente a rodaballo en gran parte de las costas Atlántica y Mediterránea.

La principal vía de transmisión de este parásito es a través del agua. Entre los factores de riesgo que pueden intervenir en el desarrollo de la enfermedad están la temperatura del agua por encima de los 18°C, siendo óptima entre 20-23°C (Iglesias y col., 2003a); una higiene y manipulación inadecuada que pueda producir microlesiones en los peces y el hacinamiento, entre otros factores de estrés. La implementación de medidas higiénicas es la primera barrera para evitar la infección, ya que es mucho más sencillo tratar al parásito cuando aún no ha penetrado en el pez, a través del uso de químicos como la formalina o el peróxido de hidrogeno, o el empleo de antibióticos (Iglesias y col., 2002; Quintela y col., 2003), aunque la actual legislación europea es muy compleja y restrictiva, limitando bastante las posibilidades terapéuticas frente a la aparición de brotes patológicos en los animales en cultivo. Con frecuencia, en las instalaciones en las que se producen problemas de escuticociliatosis, también suelen existir otros problemas asociados, producidos por infecciones bacterianas y parasitarias, por lo que el control de la calidad del agua es fundamental (Regulación de las vacunaciones en España: real Decreto 1614/2008 (BOE 07/10/2008); Hedley y Hungtington, 2009).

### **3.- Diagnóstico y tratamiento de la escuticociliatosis**

El diagnóstico de la escuticociliatosis se lleva a cabo a través de la realización de frotis de úlceras, sangre, etc., extracción de líquido ascítico y observación al microscopio óptico (Iglesias y col., 2001; Kim y col., 2004) o

mediante histología (Iglesias y col., 2001, Paramá y col., 2006). Para determinar la especie es necesario recurrir a diagnóstico por PCR (Paramá y col., 2006, Rossteuscher y col., 2008; Song y col., 2009; Smith y col., 2009) y/o al empleo de tinciones de plata con el fin de poder observar caracteres taxonómicos relevantes para la identificación (Dragesco y col., 1995; Iglesias y col., 2001; Budiño y col., 2011).

El control de las enfermedades en acuicultura se lleva a cabo a través del empleo de tratamientos químicos, antibióticos y vacunas. En la actualidad se están realizando también muchas investigaciones en relación al uso de inmunoestimulantes (Paramá y col., 2004; Iglesias y col., 2002; Jin y col., 2010, Harikrishnan y col., 2010a; 2012a; 2012b). En *P. dicentrarchi* se han realizado diversos estudios para encontrar un tratamiento quimioterapéutico efectivo como por ejemplo el uso compuestos con anillos de piperacina (Quintela y col., 2003) o el empleo de compuestos naturales como los antioxidantes, que poseen una importante efectividad *in vitro* (Leiro y col., 2004a; Lamas y col., 2009; Morais y col., 2009; Budiño y col., 2012) y que además reducen la respuesta inflamatoria, obteniéndose diferentes niveles de eficacia terapéutica aunque sin llegar a ser total con ninguno de ellos.

Al existir una regulación muy exigente en cuanto a los tratamientos permitidos en acuicultura, la vacunación constituye el método con mayores posibilidades de ser utilizado frente a la escuticociliatosis. Se han investigado tratamientos inmunoestimulantes con microesferas de quitosano (Paramá y col., 2005; León-Rodríguez y col., 2013). Con el empleo de formulaciones de vacunas que contienen escuticociliados inactivados se han obtenido buenos resultados, produciendo una buena respuesta de anticuerpos en el pez frente a las cepas homólogas, sin embargo, no hay protección cruzada entre cepas heterólogas (protección dependiente del serotipo) (Woo y col., 1987; Leiro y col., 2004b; Sanmartín y col., 2008; Piazzón y col., 2008; 2013; Palenzuela y col., 2009, Budiño y col., 2011).

Algunos estudios recientes se están centrando en seleccionar individuos más resistentes (Pardo y col., 2008; 2012; Rodríguez-Ramilo, 2013; Domínguez y col., 2013) y en la búsqueda de los componentes del sistema inmunitario que juegan un papel clave en la defensa frente a *Philasterides*. En este sentido se ha observado que los factores humorales de la respuesta inmune del pez, en especial el complemento, son muy importantes en la defensa frente a escuticociliados (Leiro y col., 2008; Piazzón y col., 2011b).

## **4. Biología de *Philasterides dicentrarchi***

### **4.1.- Morfología de ciliados: *P. dicentrarchi***

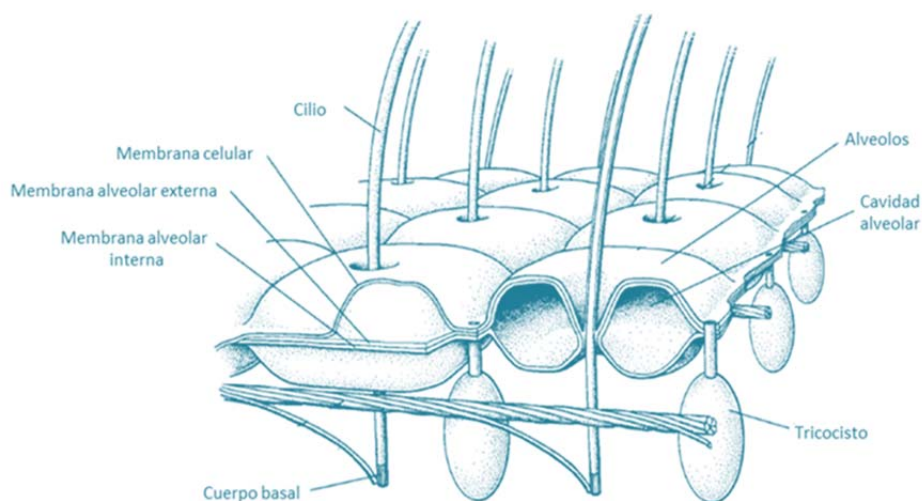
Al tratarse de organismos unicelulares, los ciliados no poseen células especializadas para distintas funciones (alimentación, balance osmótico, movimiento...), por lo que su estructura es mucho más compleja. Se caracterizan por poseer dimorfismo nuclear, son heterocariontes. Presentan al menos un micronúcleo generativo diploide, con un genoma completo y solamente activo durante la reproducción sexual por conjugación (otra de sus características más representativas) (Katz, 2001; Álvarez-Pellitero y col., 2004); un macronúcleo vegetativo poliploide, con un genoma incompleto y que está transcripcionalmente activo durante el desarrollo somático y el mantenimiento de las funciones y fisiología celulares. Además, en los ciliados aeróbicos existe también un genoma mitocondrial.

Entre sus particularidades también está la posesión de un gran número de cilios cubriendo su superficie (Lynn y Small, 2000).

Otra las características más distintivas de los ciliados es la existencia de una corteza muy compleja que le aporta consistencia y forma a la célula manteniendo su elasticidad. En la corteza se encuentra un sistema de sacos alveolares planos (**fig. 2**), una zona continua localizada todo a lo largo de la periferia celular que cumple un importante papel en el intercambio iónico y

que también contiene mitocondrias y diferentes tipos de vesículas, entre otros orgánulos (Stelly y col., 1995). Los ciliados también cuentan con numerosas vacuolas citoplasmáticas que emplean para diferentes funciones, como las digestivas, y una vacuola contráctil que controla la osmorregulación celular.

Los alveolos, junto con la membrana, conforman la película, la cual está cubierta de cilios locomotores (Möller y Anders, 1986; Lynn y Corliss, 1991). Al estar la célula cubierta de cilios se necesitan importantes cantidades de  $\text{Ca}^{+2}$  para su motilidad, además de emplearse también para la señalización intra y extracelular y a nivel de la infraciliatura para regular la contractilidad. Parte de este  $\text{Ca}^{+2}$  se libera a través de los tricocistos (**fig. 2**). En *Paramecium* el  $\text{Ca}^{+2}$  es secuestrado activamente hacia dentro de los alveolos, en un proceso dependiente de ATP y  $\text{Mg}^{+2}$  (Stelly y col., 1995; Sahoo y col., 2004; Plattner y Klauke, 2001).



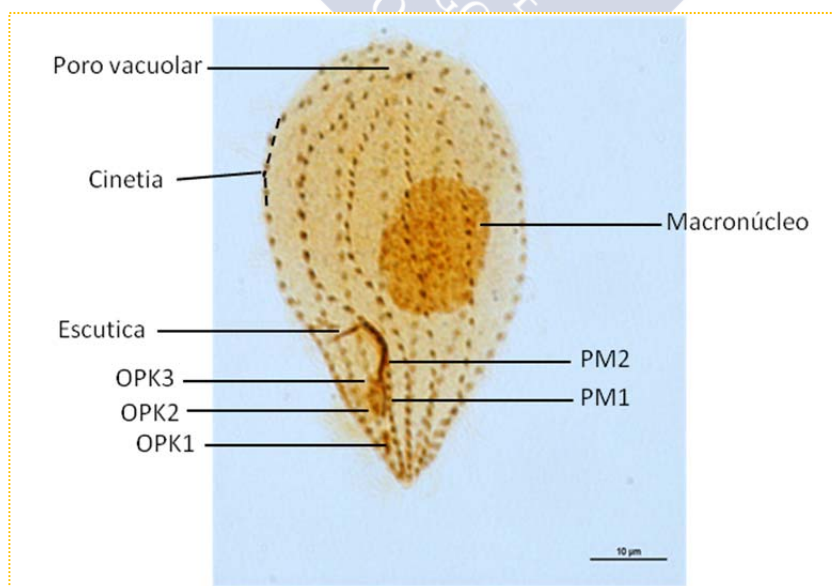
**Figura 2:** Estructura del córtex en *Paramecium* (modificado de Corliss, 1979).

La disposición de los cilios en hileras que emplean para nadar y alimentarse, recibe el nombre de cinetias; conformando un patrón o ciliatura somática característico, que resulta un rasgo taxonómico muy relevante a nivel de clasificación. *P. dicentrarchi* posee entre 13 y 14 cinetias, dicinétidas



anteriormente y monocinéticas en la zona posterior. En la base del cilio se localiza el cuerpo basal ciliar (**fig. 2**) o cinetosoma, pudiendo ser simple o doble y conjuntamente con el cilio forma la cinétida. En la región anterior se localiza el citostoma, que junto con las policinéticas orales y la membrana paraoral constituyen el aparato bucal del ciliado. En *P. dicentrarchi* pueden observarse 3 policinéticas orales (OPK<sub>1</sub>, OPK<sub>2</sub>, OPK<sub>3</sub>) y una membrana paraoral constituida por dos piezas (PM<sub>1</sub>, PM<sub>2</sub>) (**fig. 3**). En el extremo posterior se localiza el citoprocto, o ano celular, entre la primera y la última cinetia (Lynn y Corliss, 1991; Dragesco y col., 1995; Lynn y Small, 2000; Iglesias y col., 2001; Pan y col., 2015).

*P. dicentrarchi* tiene forma ovoide, aplanada lateralmente, con el extremo anterior afilado y el extremo posterior redondeado, en donde dispone de un cilio caudal más largo que los demás. También está presente la escutica, propia de escuticociliados, que se forma durante la morfogénesis del sistema oral, y después desaparece. Comenzando en la zona de la escutica, muestra un meridiano director, sin cilios, que se fusiona con la primera cinetia en el extremo posterior, pudiéndose observar en esta zona el poro de la vacuola contráctil (**fig. 3**).



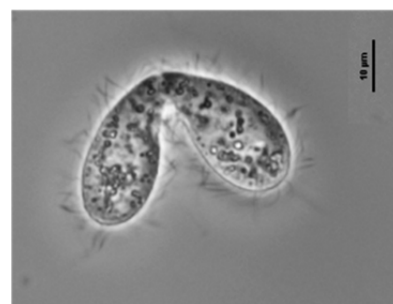
**Figura 3:** Morfología de *P. dicentrarchi* impregnado con plata.

Muchos ciliados pueden cambiar su morfología en respuesta a señales externas y/o internas. La inanición por ejemplo, induce la transformación de la cepa *Miamiensis avidus* Ma/2 en una forma “tomite”, que no se alimenta, a través del uso de una señal de un factor soluble. Esta forma también se desarrolla cuando el cultivo entra en fase estacionaria y/o existen cambios en el pH del medio por lo cual se supone que estos cambios en la morfología podrían tener la función de incrementar la supervivencia en *M. avidus* en respuesta a factores ambientales de estrés. Otra teoría postula que podría tratarse de un ejemplo de diferenciación celular primitiva. Este tipo de formas también se han detectado en otros ciliados del género *Uronema* y *Pseudochonilembus* (Gómez-Saladín y Small, 1993a, b, c).

#### 4.2.- Reproducción en ciliados: *P. dicentrarchi*.

Los ciliados, además de presentar reproducción sexual por conjugación, también poseen reproducción asexual por bipartición siendo este último su medio más común de división. Durante la fisión binaria transversal, el aparato bucal permanece en el individuo anterior o próter y en el posterior, el opiste, se produce una nueva boca. El proceso de división de las estructuras ciliares orales se conoce como estomatogénesis (Lom y Dyková, 1992).

Durante la división sexual, que normalmente sucede durante situaciones adversas, los preconjugantes se acercan y establecen contacto, se fusionan por sus regiones orales y establecen un puente citoplasmático. Seguidamente, el macronúcleo se desintegra mientras que el micronúcleo se divide por meiosis resultando 4 núcleos haploides. Posteriormente, el pronúcleo



**Figura 4:** Fotografía de 2 conjugantes de *P. dicentrarchi* obtenida por microscopía de



migratorio se fusionará con el de la célula con la que está conjugando. La conjugación solamente ocurre entre ciliados conjugantes (**fig. 4**) compatibles y no implica un aumento del número de individuos, sino un intercambio de material genético (Lom y Dyková, 1992).

#### **4.3.- Taxonomía de escuticociliados; *P. dicentrarchi*.**

Los escuticociliados son el taxón más problemático de los ciliados con respecto a relaciones sistemáticas debido a que las primeras clasificaciones se establecieron en base a la estomatogénesis (Small, 1967) y muchas especies tienen una morfología similar que no ha sido estudiada empleando métodos moleculares (Gao y col., 2010). Este problema persiste especialmente en el orden Philasterida que comprende 70 géneros (Gao y col., 2012).

Los escuticociliados se clasifican filogenéticamente dentro del Clado Alveolata, grupo probablemente de origen monofilético, que comprende ciliados, apicomplejos y dinoflagelados, caracterizados todos ellos por la presencia de alveolos corticales, que debido a las diversas funciones que realizan, les confieren una mayor complejidad celular. Basándose únicamente en las relaciones filogenéticas, dentro de Alveolata estaría el Superphylum Heterokariota, Phylum Ciliophora, Clase Oligohymenophorea, Subclase Scuticociliatia. *Philasterides dicentrarchi* pertenecería al Orden Philasterida, Familia Philasteridae, Género *Philasterides*, (Cavalier-Smith y col., 1993; Dragesco y col., 1995).

Posteriormente a esta clasificación surgió el clúster de los Chromalveolata (Alveolata en conjunto con Chromista, de Cavalier-Smith y col., 1998) propuesto por Adl y col en 2005 en base a estudios de ultraestructura y moleculares, que propone un sistema de jerarquía sin denominaciones formales (Adl y col., 2005). Según esto, los escuticociliados se clasificarían del siguiente modo:

**Eukaryota** Chatton, 1925

**Chromalveolata** Adl y col., 2005

**Alveolata** Cavalier-Smith, 1991

**Ciliophora** Doflein, 1901

**Intramacronucleata** Lynn, 1996

**Oligohymenophorea** de Puytorac y col., 1974

**Scuticociliatia** Small, 1967

Una de las teorías evolutivas en algas sugiere un ancestro común para los Alveolata, que contendría un plástido derivado de un alga roja. En *Tetrahymena* y *Paramecium* se han identificado 16 proteínas con este posible origen (Reyes Prieto y col., 2008; Köhler y col., 1997), sin embargo, según la clasificación más reciente de eucariotas (Adl y col., 2012) que estudia el posible origen polifilético del clúster Chromalveolata, incorporando avances recientes a través de criterios de filogenia realizada mediante el uso de secuencias de ARN ribosómico, se propone SAR como un grupo compuesto por Rizaria (Cercozoa, Radiolaria y Formaminífera), Alveolata y Stramenopiles (algas pardas, diatomeas y muchos hongos zoospóricos con los Haptophyta y Cryptophyceae) (Burki y col., 2007). Según esta clasificación (Adl y col., 2012), *P. dicentrarchi* estaría incluido en:

**Eukaryota** Chatton 1925

**Diaphoretickes** Adl y col., 2012

**Alveolata** Cavalier-Smith, 1991

**Ciliophora** Doflein, 1901

**Intramacronucleata** Lynn, 1996

**Oligohymenophorea** de Puytorac y col., 1974

**Scuticociliatia** Small, 1967

**Philasterida** Small, 1967

Los métodos moleculares, especialmente la determinación de la secuencia del gen de la subunidad pequeña del ARN ribosómico (SSUrRNA), han sido utilizados comúnmente para investigar las relaciones filogenéticas en escuticociliados (Jung y col., 2005; 2011; Li y col., 2006) aunque se ha determinado que se necesitan marcadores moleculares adicionales para solucionar la posición filogenética de los escuticociliados y resolver algunas incongruencias que surgen dependiendo de los criterios que se establezcan para realizar la filogenia (Gao y col., 2012).

## 5.- Ecología de ciliados

Los protozoos son eucariotas unicelulares muchos de ellos heterótrofos, ocupando un sitio clave en la cadena alimenticia microbiológica. Los que se alimentan de bacterias recuperan la materia orgánica particulada que se encuentra disuelta en el agua y a través de la excreción contribuyen a la remineralización de nutrientes.

Incluidos en los protozoos, los ciliados colonizan un amplio espectro de nichos ecológicos debido a su capacidad para adaptarse fácilmente a diferentes condiciones medioambientales como por ejemplo, la variación en las concentraciones de oxígeno en el medio (Fenchel y Finlay, 2008; Rocke y Liu, 2014), siendo muchos de ellos parásitos, pudiendo ser ecto, o endoparásitos, oportunistas u obligados (Fenchel, 1980; Dickerson y Clark., 1996). Algunos ciliados aparecen en la interfase óxica/anóxica y están presentes a través del hipolimnion anóxico y por debajo de la oxiclina en hábitats eutróficos (Miracle y col., 1992; Hayward y col., 2003; Fenchel, 2014), comportándose como microaerófilos. Los microaerófilos crecen mejor y muestran preferencia quimiosensorial por las tensiones de O<sub>2</sub> en un rango entre 0-10% de saturación siendo por ejemplo, en el caso del ciliado *Uronema filificum*, de entre 1-2% (Fenchel, 2012).

Los protozoos aeróbicos pueden alcanzar su máximo consumo de oxígeno en ambientes en los que este está en muy baja concentración. En *Euplotes* se observó que mientras que el consumo de oxígeno se incrementó a medida que aumentaba su concentración en el ambiente hasta alcanzar el 100% de saturación atmosférica, el nivel de crecimiento y el tamaño celular se maximizaron a concentraciones de 4-5% de saturación ambiental y que tanto el tamaño como el nivel de crecimiento disminuyeron sobre un 30% cuando los ciliados crecieron a saturación atmosférica (Fenchel, 2012).

Los ciliados parásitos de peces pueden ser de agua marina o dulce y aunque existen muchas especies eurihalinas (Urrutxurtua y col., 2003). En algunos casos, las condiciones de baja salinidad (300-500 mOsm/kg) son favorables para su supervivencia (Takagishi y col., 2009). Los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  intracelulares son más bajos que las concentraciones externas en un amplio rango de salinidades, pero las concentraciones intracelulares de estos iones cambian más o menos proporcionalmente con los cambios de las condiciones externas. *Paramecium* y *Miamiensis avidus* se mantienen hiperosmóticos con respecto al ambiente. El significado funcional de este estado hiperosmótico, puede ser debido a la obtención de agua para operar con la vacuola contráctil, responsable de la eliminación de desechos metabólicos (Kaneshiro y col., 1969; Stock y col., 2002).

La temperatura es otro factor importante en su desarrollo. Generalmente, en ambientes naturales alcanzan su máxima densidad a finales de primavera e inicios de verano (Urrutxurtua y col., 2003).

Los escuticociliados destacan especialmente por su ubicuidad, conseguida gracias a su alta capacidad de reproducción así como su facilidad de dispersión y adaptación a cambios en el medio (Finlay y col., 1998). Muchos de ellos son parásitos facultativos de organismos acuáticos. Particularmente, los escuticociliados bentónicos son bacterívoros micrófagos, microaerófilos, y por tanto sensibles a altas concentraciones de oxígeno. *P.*

*dicentrarchi* es un escuticociliado microaerófilo de vida libre, bacterívoro, micrófago, que se comporta como histiófago cuando se encuentra como parásito oportunista (Iglesias y col., 2001).

Muchos organismos parásitos, particularmente aquellos que residen en ambientes microaerófilos, han desarrollado una serie de modificaciones en su metabolismo energético que facilitan su adaptación al parasitismo (Saz, 1981). Aunque, generalmente, las enzimas y sus metabolitos se han conservado a lo largo de la evolución, la reconfiguración metabólica del parásito y las mutaciones en sus enzimas pueden contribuir al desarrollo de rutas metabólicas que aparecen en los hospedadores y que en los parásitos están ausentes, dejando el metabolismo en manos del hospedador (Von Brand, 1973), sin embargo, también se puede dar el caso opuesto, en el que el parásito presenta enzimas exclusivas, que no se encuentren en el hospedador, pudiendo ser éstas, dianas quimioterapéuticas interesantes (Hochachka y col., 1993; Kita y col., 2003). Identificar las diferencias moleculares y bioquímicas entre los parásitos y sus hospedadores es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos quimioterapéuticos frente a infecciones parasitarias.

Las mitocondrias poseen un importante papel en el mantenimiento de las funciones de metabolismo bioenergético celular, muerte celular programada, homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  y señalización celular, entre otras. Además, en parásitos, éstas pueden ser muy diferentes a la del hospedador, tratándose por tanto de dianas atractivas para el desarrollo de fármacos (Hackstein y col., 2006).

## **6.- Bioquímica parasitaria: Metabolismo bioenergético en eucariotas y adaptaciones a condiciones de estrés**

A causa de las diferencias de hábitat de los parásitos, el metabolismo varía mucho entre especies, asociándose algunas de las adaptaciones metabólicas con una transición al parasitismo obligado (Ginger y col., 2010).

A menudo, para sobrevivir en el hospedador, los parásitos emplean sistemas metabólicos que difieren sustancialmente de los utilizados por el primero. La reconfiguración metabólica del parásito y las mutaciones en sus enzimas pueden contribuir a generar resistencias a tratamientos con diferentes fármacos así como evadir la respuesta inmunitaria innata del hospedador. Identificar las diferencias moleculares y bioquímicas entre los parásitos y sus hospedadores es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos quimioterapéuticos frente a infecciones parasitarias. Los parásitos, por lo general, poseen una alta tasa de multiplicación o crecimiento, lo que se traduce en una importante demanda de generación de energía que van a obtener empleando diferentes estrategias (Hochachka y col., 1993; Kita y col., 2003; Hackstein y col., 2006).

Existen diversos ambientes pobres en oxígeno como pueden ser los sedimentos y algunas zonas de la columna de agua o el intestino, en los cuales los parásitos que ahí habitan presentan estrategias adaptativas que comprenden tanto cambios fisiológicos como bioquímicos hacia el empleo de rutas metabólicas más ventajosas en condiciones de restricción de oxígeno (Hochachka y col., 1993). Se ha visto que muchos de los parásitos que habitan en ambientes limitantes en oxígeno son particularmente sensibles al estrés oxidativo, teniendo además que superar el coste energético que supone la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen durante el metabolismo (Docampo, 1995; Genestra y col., 2007). Lo más eficiente en condiciones de estrés por limitación de oxígeno es la supresión del metabolismo energético, coordinada con una consecuente supresión de la demanda energética, para minimizar el daño causado por los cambios fisiológicos derivados de la falta de oxígeno que pueden ocurrir debido a la pérdida de la homeostasis celular y emplear adaptaciones metabólicas protectoras para recuperarse después de la hipoxia (Hochachka y col., 1993).

La hipoxia modula la expresión de diferentes genes así como el crecimiento y los niveles de respiración en algunas especies de ciliados (Hochachka y col., 1993). Una de las proteínas que se ven moduladas por hipoxia son las proteínas de choque térmico (Hsp70), que se expresan constitutivamente en las células; su expresión puede estar inducida en respuesta a variedad de condiciones de estrés tanto bióticas como abióticas, como podría ser la adaptación a diferentes salinidades, funcionando como inhibidoras de la apoptosis (Smurov y col., 2007; Minguez y col., 2013).

Otra de las proteínas reguladas en condiciones de estrés salino es el transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que se ha localizado en parásitos como *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei*, y *Toxoplasma gondii* (Docampo y col., 2013).

### **6.1.- Mitocondria: la cadena de transporte electrónico en la respiración mitocondrial**

La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta por varios sistemas transportadores de electrones que se sitúan en la membrana interna mitocondrial de la misma. El objetivo funcional de la cadena de transporte de electrones (CTE) es generar un gradiente electroquímico que se empleará para la síntesis de ATP.

En la membrana mitocondrial interna es en dónde tiene lugar la fosforilación oxidativa en eucariotas, esto es, la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  a través de la oxidación del nicotinamida adenina dinucleótido –NADH- y el flavín adenina dinucleótido –FADH<sub>2</sub>- (generados en el ciclo del ácido cítrico, la glucólisis o la beta oxidación) en un proceso que libera energía en forma de ATP. La energía liberada por el flujo de electrones es usada para el transporte de protones a través de la membrana interna mitocondrial mediante la actuación de varios complejos enzimáticos (I-IV), que constituyen la cadena de transporte de electrones. La función principal de estos complejos es la de



transferir la energía secuencialmente para así maximizar la producción de ATP (Lodish y col., 2000; Lehninger, 2014).

El desencadenante de la reacción es la unión de una molécula de NADH al complejo I. El NADH contiene electrones con un alto poder de transferencia, que liberan gran cantidad de energía con cada proceso de oxidación. La NADH deshidrogenasa o complejo I constituye el primer complejo transportador de electrones. Esta enzima transfiere los electrones a la coenzima Q10 o ubiquinona, una pequeña molécula liposoluble que difunde con facilidad a través de la membrana, y se convierte en ubiquinol (forma reducida) (Lodish y col., 2000; Lehninger, 2014; Verner y col., 2014).

La succinato deshidrogenasa o complejo II constituye el segundo punto de acceso a la CTE. Este complejo transfiere los electrones del  $\text{FADH}_2$ , generado durante la conversión de succinato a fumarato, a la coenzima Q. Esta reacción tiene lugar en el espacio interno de la membrana mitocondrial (Lodish y col., 2000; Lehninger, 2014; Verner y col., 2014).

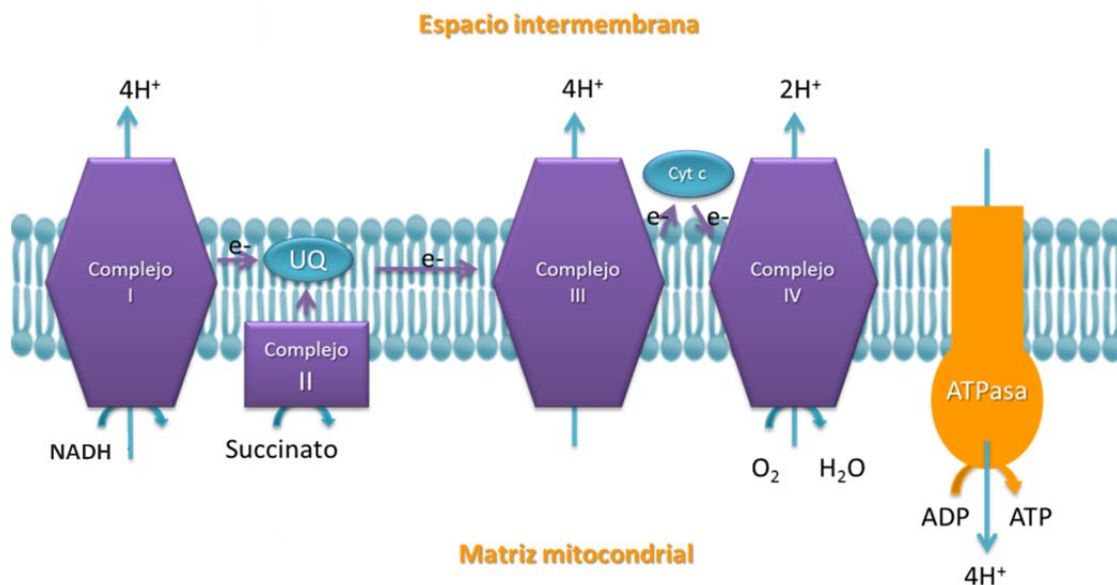
Los electrones derivados de la coenzima Q, provenientes a su vez del complejo I o II, son transferidos al complejo III o complejo citocromo b-c-1, cuyo nombre hace referencia a que estos dos citocromos son sus principales componentes.

Los electrones provenientes del complejo III son transportados de uno en uno por el citocromo c hasta el complejo citocromo c oxidasa o complejo IV, que lleva a cabo el final de la reacción transfiriendo los electrones a su aceptor final, el  $\text{O}_2$ , que es reducido a agua, mientras que los protones son bombeados a través de la membrana generando un gradiente. Por tanto, la reacción catalizada es la oxidación del citocromo c y la reducción del oxígeno a agua (Lodish y col., 2000; Lehninger, 2014; Verner y col., 2014).

En todo este proceso, y acompañando al transporte de electrones, se produce el bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana por las complejos I, III y IV generando un gradiente electroquímico de protones.



Por otro lado, la coenzima Q toma también protones de la matriz y los transfiere al espacio intermembrana. Los estudios recientes sobre los complejos respiratorios mitocondriales en levaduras y en células de mamíferos indican que los cuatro complejos enzimáticos no se encuentran dispuestos al azar en la membrana mitocondrial interna, sino que al menos los complejos I, III y IV forman supercomplejos en la membrana mitocondrial interna (**fig.5**) (Enriquez y Lenaz, 2014).



**Figura 5:** Esquema representativo de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Modificado de McDonald y col., 2009.

El transporte de protones de la matriz al espacio intermembrana genera un incremento del pH en la matriz y una disminución del mismo en el espacio intermembrana así como un gradiente de voltaje en la membrana mitocondrial interna; dando como resultado la formación de un gradiente electroquímico que tiende a llevar los protones de vuelta a la matriz. El gradiente electroquímico generado va a conducir no solamente a la síntesis de ATP sino también al transporte de determinadas moléculas a través de la membrana mitocondrial interna.

La síntesis de ATP se produce cuando los protones fluyen hacia la matriz a través de la ATP sintasa, un complejo enzimático multimérico capaz de sintetizar ATP a partir de ADP y Pi (Xu y col., 2015).

Existen varios fármacos que inhiben la fosforilación oxidativa en diferentes puntos de la CTE. El complejo I es inhibido por la rotenona, por ejemplo (Koopman y col., 2010). La antimicina A (AMA) es un inhibidor del complejo III mientras que el cianuro (KCN) y la azida sódica actúan como inhibidores del complejo IV (Kakkar y Singh, 2007; Verner y col., 2014). De igual forma, la oligomicina es un potente inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial (Symersky y col., 2012).

Durante la respiración mitocondrial se generan radicales libres altamente inestables, como el ion superóxido o radicales hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) (Docampo, 1995; Genestra y col., 2007), tratándose la mitocondria de la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el metabolismo normal. Se estima que aproximadamente un 1% del  $\text{O}_2$  consumido por la misma es utilizado para producir anión superóxido (Quinlan y col., 2012). Se han descrito al menos ocho sitios posibles de producción de ROS en la mitocondria (Murphy, 2009), aunque la contribución relativa de cada uno de ellos es desconocida. Entre los sitios de producción de ROS destacan los complejos respiratorios; mientras que los complejos I y II liberan ROS a la matriz, el complejo III lo hace a ambos lados de la membrana interna (Müller y col., 2003). El nivel de ROS producidos por la mitocondria se ve incrementado por condiciones variables o patológicas como la hipoxia y la inhibición química de la respiración mitocondrial (Chen y col., 2003, de Graaf y col., 2011).

#### *6.1.1.- Adaptaciones de la mitocondria y la CTE en parásitos.*

Aunque en los primeros estudios hechos con parásitos intracelulares se postulaba que carecían de mitocondrias porque se habían separado de otros

eucariotas antes del proceso de endosimbiosis, los estudios más recientes indican que los eucariotas estudiados tienen orgánulos de doble membrana de origen mitocondrial (Embley y Martin, 2006). Entre estos orgánulos cabe destacar los hidrogenosomas de *Trichomonas*, denominados así porque producen hidrógeno molecular gracias a la presencia de una hidrogenasa, o los mitosomas de *Entamoeba histolytica*, los cuales se conocen como “orgánulos relacionados con la mitocondria” (MROs), fruto de la alteración y reducción de las funciones de la mitocondria que surgieron como adaptación a condiciones restrictivas de oxígeno (Hackstein y col., 2006; Seeber y col., 2008; Makiuchi y Nozaki, 2014).

Müller y col. (2012) han propuesto una clasificación funcional de MROs en 5 clases (**tabla 1**), en base al metabolismo energético: mitocondrias aeróbicas (clase 1) que generan ATP por fosforilación oxidativa y usan oxígeno como aceptor de electrones; mitocondrias anaeróbicas (clase 2), que generan ATP pero usan aceptores alternativos como el fumarato o nitrato (*Ascaris lumbricoides*, *Trypanosoma brucei*); mitocondrias que producen hidrógeno (clase 3), las cuales poseen una cadena transportadora de electrones pero generan hidrógeno (*Nyctotherus ovalis*, *Blastocystis* sp.); hidrogenosomas (Clase 4), los cuales producen ATP e hidrógeno y carecen de cadena transportadora de electrones (e.g. *Trichomonas vaginalis*, *Piromyces* sp.); y mitosomas (Clase 5), orgánulos que no producen ATP y carecen de cadena de transporte electrónico (*Giardia instestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Encephalitozoon cuniculi*). Otra diferencia importante es que mientras las mitocondrias poseen genoma, los MROs, con alguna excepción, suelen carecer de él (Makiuchi y Nozaki, 2014).

*Trypanosoma brucei* presenta un complejo ciclo de vida ya que se mueve desde la sangre del hospedador humano a la mosca tse-tse, encontrándose condiciones ambientales muy diferentes a las cuales responde con cambios importantes en la mitocondria. En la etapa de tripomastigotes

procíclicos la cadena respiratoria se presenta ramificada. A pesar de poseer los 4 complejos respiratorios, los dos primeros aparecen modificados (van Hellemond y col., 2015). En helmintos como *Fasciola hepática* y *Ascaris lumbricoides*, el complejo mitocondrial forma  $H_2O_2$  desde el  $O_2$  en lugar de  $H_2O$  y es insensible a KCN, azida y AMA. Existen evidencias de que su mitocondria contiene una cadena respiratoria ramificada con dos oxidasas terminales, una de ellas ligada a la producción de  $H_2O_2$  (Docampo, 1995) y la CTE clásica hasta la citocromo c oxidasa está generalmente ausente o tiene muy baja actividad (Hochachka y col., 1993; Kakkar y Singh, 2007).

*Nyctotherus ovalis* es un ciliado anaeróbico que habita en el intestino de cucarachas, posee un orgánulo mitocondrial parecido a un hidrogenosoma, pero contiene cadena de transporte de electrones y genoma, por lo que se considera un orgánulo intermedio entre la mitocondria y el hidrogenosoma (Müller y col., 2012). Sin embargo, su cadena respiratoria está incompleta; posee genes que codifican para componentes de los complejos I y II pero carece de los genes que codifican para los complejos III y IV, y la ATP sintasa (de Graaf y col., 2011). Además, se ha comprobado que este orgánulo es sensible a los inhibidores del complejo I y produce succinato como producto final del metabolismo. Se cree que su origen puede ser el de una mitocondria que ha ido adquiriendo las enzimas necesarias para funcionar en condiciones de anaerobiosis, o que mitocondrias e hidrogenosomas evolucionaron desde un ancestro común y después se especializaron (Boxma y col., 2005). En el protozoo anaeróbico *Blastocystis* también existe un orgánulo a caballo entre la mitocondria y el hidrogenosoma; posee material genético y potencial transmembrana, y aunque presenta los complejos I y II de la respiración mitocondrial, los complejos III y IV, y la ATPasa, están ausentes (Stechmann y col., 2008).

Los hidrogenosomas son orgánulos que, por definición, producen ATP e hidrógeno, usando protones como aceptores de electrones. Algunas especies

de organismos anaeróbicos poseen un hidrogenosoma que produce  $H_2$  y ATP a partir de la oxidación de piruvato o malato (De Graaf y col., 2011). Los electrones del donador son empleados por la ferredoxina-oxido-reductasa y la hidrogenasa, enzimas ausentes en la mitocondria, para producir  $H_2$  (Martin y col., 2005; Hackstein y col., 2006; Müller y col., 2012). En el caso de *Trichomonas*, los hidrogenosomas no poseen ATP sintasa ni crestas, pero intervienen en el metabolismo del piruvato, incorporan  $Ca^{+2}$ , o se dividen de una forma similar a la mitocondria. Los hidrogenosomas se encuentran en muchos organismos que no están estrechamente relacionados como flagelados anaeróbicos, algunos hongos y varios ciliados anaeróbicos (Boxma y col., 2005), lo cual se piensa que puede ser debido a que estos orgánulos cumplen una misma función esencial para la célula y por eso ha evolucionado para adaptarse a las diferentes condiciones ambientales en lugar de desaparecer (Embley y col., 2003).

Los mitosomas no producen hidrógeno ni ATP. El parásito apicomplejo *Cryptosporidium parvum* posee un mitosoma con capacidad metabólica muy reducida y que no posee genoma (Alock y col., 2012), por lo que es totalmente dependiente del genoma nuclear para obtener proteínas funcionales (Henríquez y col., 2005). Algunos microsporidios anaerobios también carecen de metabolismo energético mitocondrial y poseen mitosomas, como *Giardia*, por ejemplo (Ginger y col., 2010; Williams y col., 2010). Al tratarse de parásitos que habitan en el tracto digestivo al igual que ocurre con los que colonizan el tracto reproductivo, la reducida disponibilidad de  $O_2$  ha ocasionado que posean un sistema alternativo a la respiración oxidativa para la obtención de energía. Esta estrategia evolutiva se basa en la fermentación anaeróbica a partir de glucosa o aminoácidos, lo que provoca que para el caso de este tipo de parásitos, el enzima clave sea la fosfofructoquinasa PPI dependiente (PPI-PFK), y por tanto la energía sea dependiente de PPI inorgánico (PPI) en lugar de ATP (Ginger, 2006).

Según Müller, los MROs se clasifican en 5 clases diferentes basándose la capacidad de producir ATP y el compuesto de aceptor de electrones (**Tabla 1**):

Clase		Producción de ATP	Generación de H <sub>2</sub>	Cadena de transporte e <sup>-</sup>	Uso de O <sub>2</sub> como aceptor
1	Mitocondria aeróbica	No	Si	No	No
2	Mitocondria anaeróbica	No	Si	No	Si
3	Mitocondria productora de H <sub>2</sub>	No	No	No	Si
4	Hidrogenosomas	No	No	Si	Si
5	Mitosomas	Si	Si	Si	--

**Tabla 1:** Clasificación de los orgánulos derivados de la mitocondria (MROs). Modificado de Müller y col., 2012.

Los MROs poseen modificaciones de la CTE, gracias a ello existirán diferencias entre la CTE de parásitos y la del hospedador, por lo que los MROs podrían ser interesantes para la búsqueda de nuevas dianas quimioterapéuticas, permitiendo desarrollar tratamientos que afectasen únicamente al parásito.

## 6.2.- Ruta alternativa de la respiración mitocondrial; Oxidasa alternativa (AOX)

La AOX es una proteína insensible al KCN localizada en la membrana interna mitocondrial que capta los electrones de la ubiquinona y los transfiere al O<sub>2</sub>, permitiendo la formación de una ruta de transporte alternativa a la



cadena de transporte electrónico descrita previamente (**fig. 6**) (McIntosh, 1994; Sircar y col., 2012). A diferencia de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria, donde el transporte electrónico está acoplado a la translocación de protones, el transporte a través de la AOX no genera ATP, por lo que la energía derivada de la oxidación del ubiquinol se pierde en forma de calor (Albury y col., 2009; Rogov y col., 2015).

#### 6.2.1.- Distribución de la AOX

La AOX es una proteína de la cadena respiratoria que se encuentra ampliamente distribuida en plantas, hongos, levaduras no fermentativas y protozoos (Henry y Nyns, 1974; Lambowitz y col., 1989; Sakajo y col., 1991, 1997; Jarmuskiewicz y col., 1997, 1999, 2001b, 2002; Maxwell y col., 1999; Moore y col., 2002; Czarna y col., 2010; Williams y col., 2010; Woyda-Ploszczyca y col., 2011). Se ha descrito en protozoos apicomplejos como por ejemplo *Cryptosporidium*, flagelados como *Trypanosoma*, amebas como *Acanthamoeba* y ciliados como *Tetrahymena thermophyla*. También está presente en algunos procariotas como las  $\alpha$ -proteobacterias, por lo que se asume que esta enzima fue adquirida en un paso temprano de la evolución a través de la endosimbiosis que dio lugar a la mitocondria en el ancestro común de eucariotas (Young, 1983; Clarkson y col., 1989; Murphy y col., 1997; Roberts y col., 2004; Chaudhuri y col., 2006; Eisen y col., 2006; Seeber y col., 2008). Mediante estudios filogenéticos se ha evidenciado que la AOX de protozoos se encuentra más próxima a la de hongos que a la de plantas o bacterias (Chaudhuri y col., 2006).

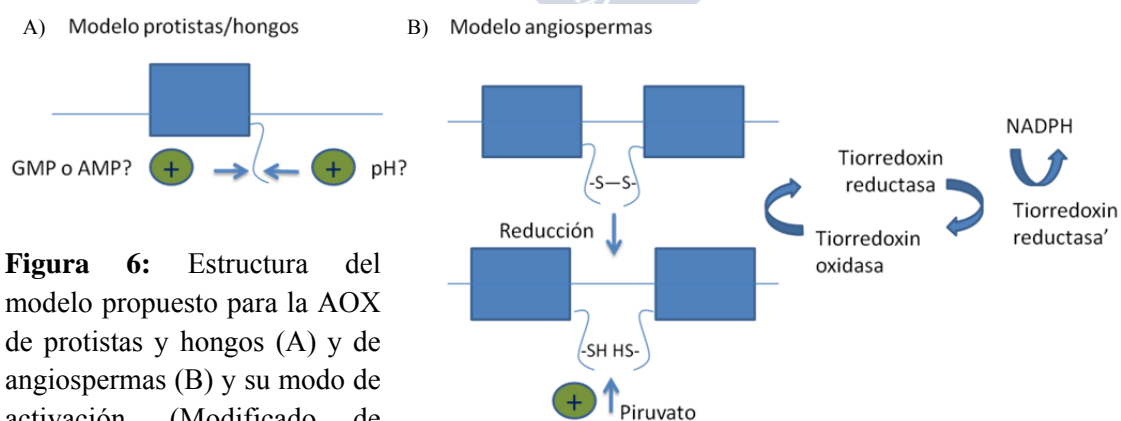
En estos organismos existen 2 vías en la respiración mitocondrial; la vía clásica, que actúa a través de la citocromo c oxidasa, sensible al KCN, y la vía alternativa, insensible al KCN, que lo hace a través de la que se conoce como AOX, que desvía la ruta desde el ubiquinol transfiriendo los electrones

directamente al  $O_2$  y reduciéndolo a  $H_2O$  (Affourtit y col., 2001; Moore y col., 2008; Williams y col., 2010; Xu y col., 2012).

### 6.2.2.- Estructura y funcionamiento de la AOX

La AOX es una proteína integral de membrana que interactúa con la bicapa lipídica a través de dos hélices hidrofóbicas cortas. Está carboxilada con dos grupos que emplea para catalizar la oxidación del ubiquinol hasta la reducción completa del  $O_2$  a  $H_2O$  (Anderson y Nordlund, 1999; Affourtit y col., 2001; Berthold y Stenmark, 2003; Moore y col., 2008). Posee una región hidrofóbica de unión al ubiquinol muy conservada (Gln242, Asn247, Tir253, Ser256, His261 y Arg262), situada entre las hélices II y III (Albury y col., 2010; Moore y Albury, 2008). En *Trypanosoma brucei* se ha descrito el residuo Tir220 como indispensable para la actividad catalítica de la enzima (Shiba y col., 2013).

Se han propuesto dos modelos estructurales para la AOX, que se distinguen por su estructura en subunidades y sus reguladores (**fig. 5**): el modelo dimérico, de plantas, y el monomérico, de hongos y protozoos (Sluse y Jarmuskiewicz, 1998; Umbach y Siedow, 2000; McDonald y col., 2009) aunque en *Trypanosoma brucei*, la AOX es un homodímero (Shiba y col., 2013).



**Figura 6:** Estructura del modelo propuesto para la AOX de protistas y hongos (A) y de angiospermas (B) y su modo de activación. (Modificado de McDonald y col., 2009).

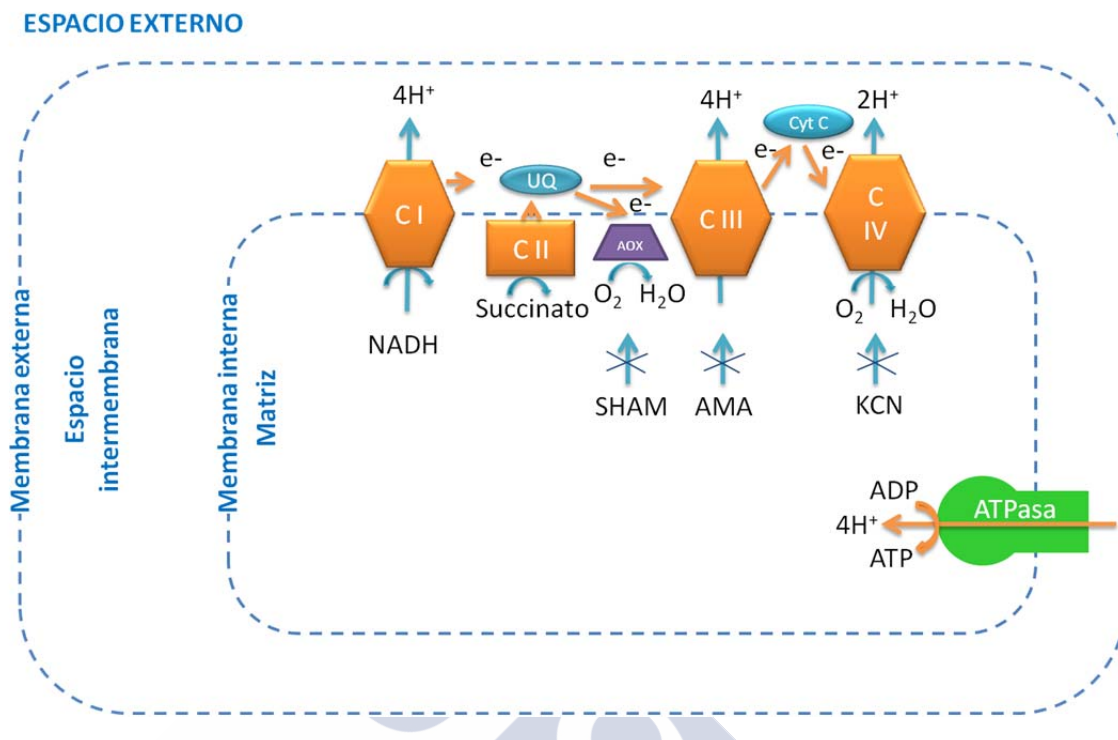


La AOX homodimérica de plantas está relativamente inactiva cuando sus subunidades están unidas por puentes di-sulfuro (**fig. 6**). Cuando estas uniones se reducen, el enzima puede ser estimulada por sus activadores,  $\alpha$ -cetoácidos y succinato, que sin embargo éstos no parecen estimular la AOX de hongos. El guanosín monofosfato (GMP) es un buen activador en hongos y en protozoos como *Acanthamoeba castellanii*; en *Plasmodium falciparum* lo es el ADP y en la levadura *Debaryomyces hansenii*, el AMP, que, a su vez, no activan a la AOX de plantas (Cabrera-Orefice y col., 2014).

Por otra parte, se ha visto que los niveles de expresión en levaduras oxidativas y hongos como *Pichia* y *Neurospora*, respectivamente, dependen de las condiciones del cultivo y de la presencia de inductores (Lambowitz y col., 1989; Umbach y Siedow, 2000, Uyemura y col., 2000), al igual que en *Trypanosoma*, en donde se ha observado que el estado del ciclo de vida también afecta a la expresión de la AOX (Chaudhuri y col., 2006).

La AOX tanto de plantas como de hongos es resistente al cianuro, pero sensible a los ácidos hidroxámicos sustituidos, como el ácido salicilhidroxámico (SHAM) (Vanlerberghe y McIntosh, 1997; Roberts y col., 2004), un inhibidor específico reversible de la ruta alternativa, que no afecta a la ruta clásica. La naturaleza del grupo radical en estos compuestos, afecta a la concentración a la cual los ácidos hidroxámicos son efectivos (Schonbaum y col., 1971).

Al existir inhibidores específicos de la ruta alternativa, el empleo de estos permite estudiar ambas rutas por separado (**fig. 7**).



**Figura 7:** Resumen esquemático de la cadena de transporte de electrones. El complejo I inicializa el proceso de flujo de electrones oxidando el NADH a NAD<sup>+</sup>. Los electrones fluyen secuencialmente a través del complejo III y IV, donde se unen al oxígeno para reducirlo hasta formar agua. Durante este proceso, cada uno de los complejos (I, II y IV), catalizan la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Los protones generados en los diferentes puntos de la cadena de transporte de electrones se emplean para generar ATP a través de la ATPasa. La ruta puede desviarse a través de la AOX para formar agua directamente: SHAM (ácido salicilhidroxámico), AMA y KCN son inhibidores específicos de cada uno de los complejos. Modificado de McDonald y col., 2009.

La capacidad de la respiración de la ruta alternativa se mide en presencia de un inhibidor de la ruta del citocromo c, como la fracción el consumo de O<sub>2</sub> resistente a ese inhibidor (Møller y col., 2001) y que es posteriormente inhibida por un inhibidor específico de la ruta alternativa (Monzote y Gille, 2010).

### 6.2.3.-Funciones de la AOX y regulación de su expresión

Desde un punto de vista funcional, la AOX debería cumplir un papel muy importante dado que ha sido conservada a lo largo de la evolución en una gran variedad de organismos.

La baja afinidad por el  $O_2$  que presenta, se piensa que podría tratarse de una adaptación a la baja concentración de  $O_2$  que había en la atmósfera primigenia de la Tierra, por lo que se propone que la proteína ancestral debe haber actuado como una reductasa de  $O_2$  temprana, operando en los primeros estadios de la transición entre la atmósfera anóxica y óxica, con la intención de reducir las ROS (Moore y col., 2002). La AOX no compite con la citocromo c oxidasa (COX) debido a su baja afinidad por el  $O_2$ , pero lo elimina del medio disminuyendo la producción de ROS (Maxwell y col., 1999; Gupta y col., 2009), por lo que se piensa que su función más relevante es la de mantener la homeostasis de la mitocondria.

En eucariotas inferiores, la función principal que se propone para la AOX también es la de detoxificación frente a ROS para mantener la homeostasis mitocondrial, pudiendo comprobarse que se trata de un factor importante para la supervivencia del patógeno en macrófagos (Magnani y col., 2007). La AOX puede incrementar la patogenicidad de algunos organismos, ya que la respuesta de defensa frente al parásito está caracterizada por la generación de ROS o tóxicos en defensa a invasores (McDonald y col., 2009) por lo que su existencia podría tratarse de una adaptación metabólica al hospedador. Otro dato que concuerda con esta hipótesis es el caso del parásito *T. brucei*, en el que la AOX solo está presente en su forma infectiva en mamíferos, la forma procíclica (Walker y col., 2005). Esta enzima permitiría la rotación del ciclo de Krebs cuando la carga energética de la célula fuese alta y así la protegería frente al estrés oxidativo (Affourtit y col., 2002). Por otra

parte, parece que la AOX podría tener un papel importante en la regulación de la muerte celular programada (Chaudhuri y col., 2006).

En plantas, los niveles de expresión de AOX están inducidos por diferentes factores de estrés; heridas, ataque de patógenos, estrés osmótico o inhibidores de la cadena respiratoria en general (Moore y col., 2002; McDonald y col., 2009) y se ha demostrado que en estos organismos la AOX juega un papel indispensable en la regulación de la termogénesis para la polinización, la fotoprotección, como defensa anti-estrés oxidativo... (Popov y col., 2003; Zhang y col., 2011; Wagner y col., 2008; Xu y col., 2012; Rogov y col., 2015). En estudios realizados en soja, se ha comprobado que el pretratamiento en anoxia genera una protección frente a la muerte celular provocada por producción de  $H_2O_2$ . Esto es debido a que durante las condiciones de anoxia funcionan la AOX y las peroxidasas (Amor y col., 2000), manifestándose su función de defensa frente al estrés oxidativo. La AOX también podría ser de gran importancia en proteobacterias, las cuales están sujetas a cambios constantes de condiciones ambientales, pudiendo así variar su metabolismo energético en función de sus necesidades (Purvis y Shewfelt, 1993).

Existe también una hipótesis en la que se postula que la ruta alternativa podría ser una vía de escape de la del citocromo c en situaciones de carencia de fosfato (Roy y col., 2008). En plantas, el PPi puede actuar como un donador de energía alternativo, especialmente bajo condiciones de estrés como pueden ser la anoxia o la privación de Pi. El PPi, que puede encontrarse en cantidades relativamente abundantes debido a su producción como subproducto de biosíntesis, permitiría así conservar en cierto modo la generación de ATP. Se ha observado que la expresión de las enzimas dependientes de PPi como la PPi-PFK y la  $H^+$ -PPasa, se ve aumentada en respuesta al estrés. La reducción en los niveles de Pi y el ADP limitan el flujo de electrones en la cadena respiratoria a través de la ruta del citocromo c, sin

embargo, este transporte podría realizarse a través de la ruta alternativa, lo que puede contribuir a la supervivencia (Plaxton, 2009). Esta hipótesis concuerda con los estudios realizados en plantas que revelan que la respiración es más baja en aquellas que carecen de Pi; cuando el ADP o el Pi son limitantes, la fuerza protón motriz se incrementa y la proporción de transporte acoplado de electrones a través de la vía del citocromo se restringe alrededor de un 20%, consecuentemente se incrementa la participación de la ruta alternativa de la respiración (Theodoru y Plaxton., 1993). Del mismo modo, se especula que una de las funciones esenciales que tendría la AOX en este caso sería la síntesis de ATP para el mantenimiento de la homeostasis y el nivel de crecimiento. Sin embargo, en algunos casos, cuando se expresa la AOX, decrece la eficiencia del metabolismo energético mitocondrial, como sucede en el caso de *Schizosaccharomyces pombe*; en el cual se traduce en una bajada en el nivel de crecimiento (Affourtit y col., 2002).

Al igual que en plantas, la activación de la AOX por la adición de AMA en *A. castellanii* y *Trypanosoma brucei*, disminuye la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jarmuskiewicz y col., 1997; Czarna y Jarmuskiewicz, 2005), y la inhibición de la AOX por uso de inhibidores específicos como el SHAM y el propil galato (PG) estimula la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Popov y col., 1997; Fang y Beattie., 2003; Roberts y col., 2004).

La presencia de la AOX en protozoos de importancia patogénica como *Trypanosoma*, (Clarkson y col., 1989; Chaudhuri y col., 2006), *Cryptosporidium* (Putignati y col., 2004; Mogi y Kita, 2010; Roberts y col., 2004) y *Plasmodium* (Mogi y Kita, 2010; Torrentino y col., 2010, Murphy y col., 1997), es muy relevante, ya que esta enzima está ausente en sus hospedadores, convirtiéndola en una posible diana terapéutica (Nihei y col., 2002; Roberts y col., 2004, Chaudhuri y col., 2006). Además se ha comprobado que el empleo de inhibidores específicos de la AOX como el SHAM y el PG no producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mitocondria de hígado de rata (Popov

y col., 1997) por lo que se podría investigar el uso de inhibidores de la AOX como quimioterapéuticos.

*C. parvum* es el único organismo descrito hasta el momento que tiene un orgánulo mitocondrial tan reducido estando presente la AOX (Henríquez y col., 2005). En *Plasmodium*, otro de los puntos interesantes que se han encontrado en la CTE es el complejo I insensible a rotenona (Murphy y col., 1997; Seeber y col., 2008). La  $F_0$ - $F_1$  ATP-sintasa (Complejo V) podría ser otra diana atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos ya que en varios estudios se han obtenido resultados de inhibición del funcionamiento de esta enzima por el empleo de polifenoles como el resveratrol y el piceatannol (Zheng y Ramírez, 2000; Morais y col., 2009). La inhibición de la ATP sintasa induce la muerte celular programada ya que causa bajada en los niveles de ATP y aumento en los ROS mitocondriales además de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial (Roy y col., 2008).

La respiración mitocondrial en el escuticociliado *P. dicentrarchi* se ha comparado a la de otros ciliados, sin embargo, su respiración no se bloquea totalmente por KCN (Morais y col., 2013), lo cual puede ser un indicativo de la existencia de una AOX en esta especie; una inhibición completa por AMA excluiría la presencia de una AOX (Uyemura y col., 2000).

### 6.3.- Detoxificación de ROS:

Las ROS como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  u  $OH^-$ , por ejemplo, son productos normales de las rutas metabólicas que actúan como mediadoras importantes en el daño celular (Genestra y col., 2007), siendo el propósito del estallido respiratorio, además de la señalización, el de generar agentes microbiocidas en fagocitos (Robinson, 2009). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, las ROS se pueden producir en exceso, pudiendo resultar tóxicas o dañinas (Young y Woodside, 2001; Hancock y col., 2001b; Rathore y col., 2011).

A pH neutro, dentro del sistema celular, el  $O_2^-$  es un radical libre moderadamente estable, sin embargo, su ácido conjugado, el hidroxilo ( $OH^-$ ), es altamente reactivo. La toxicidad del  $O_2^-$  está basada principalmente en la generación de ROS, las cuales son capaces de atacar a la biomoléculas intracelulares, por ejemplo, el  $O_2^-$ , que es rápidamente transformado en  $H_2O_2$ , especialmente a pH bajo, y éste, puede entrar fácilmente a través de las membranas resultando altamente tóxico (Bernard y Babior, 2000; Hancock y col., 2001a; Kakkar y Singh, 2007; Robinson, 2009). Las enzimas implicadas en la detoxificación celular, como la catalasa, la peroxidasa o la superóxido dismutasa (SOD), en protozoos, poseen actividades, si existen, más bajas que en mamíferos (Docampo, 1995). Además de a través de enzimas antioxidantes, la detoxificación de ROS, también puede ocurrir a través de la mediación de determinados compuestos de bajo peso molecular como por ejemplo las vitaminas C y E (Docampo, 1995).

El complejo I es una fuente importante de generación de ROS por la NADH deshidrogenasa localizada en la matriz de la membrana interna, desde donde se disipan en la mitocondria como defensa antioxidante, aunque en la mitocondria, el complejo III parece ser el principal productor de ROS durante la oxidación de los sustratos del complejo I (Chen y col., 2003, de Graaf y col., 2011).

La producción de ROS aumenta con el incremento del potencial de membrana en eucariotas; existe la hipótesis de que en condiciones normales fisiológicas, el potencial de membrana se encuentra relativamente bajo (controlado), y que este se ve aumentado en condiciones de estrés, para intentar maximizar la producción de ATP (Kadenbach y col., 2013). Existen muchos fármacos que actúan sobre el potencial de membrana y la generación de ROS como por ejemplo la artemisinina (ART), componente activo de la herbácea *Artemisia annua*, L., de uso extendido como tratamiento frente a la malaria, cuyo mecanismo de acción se basa en es la generación de radicales



libres que causan la destrucción de las células sanguíneas (Golenser y col., 2006; Ekanem y col., 2010; Monzote y Gille, 2010).

#### **6.4.- Papel de la mitocondria en la muerte celular:**

Aunque la terminología usada para describir los tipos de muerte celular está cambiando (Galluzi y col., 2015), se han descrito tres tipos de muerte celular: necrosis, apoptosis (muerte celular programada) y autofagia. La principal diferencia entre la muerte celular por necrosis y apoptosis reside en el nivel bioenergético; los niveles de ATP bajan rápidamente en células que están muriendo por necrosis y esta pérdida de energía se cree que es una de las causas primarias de muerte celular. Las células que están bajo necrosis pueden ser rescatadas de la muerte celular restaurando parcialmente su nivel energético por interferencia metabólica. Sin embargo, las que se encuentran bajo procesos de apoptosis, mantienen sus reservas de ATP, el cual precisan para terminar la muerte celular programada (Genestra y col., 2007; Kakkar y Singh, 2007). La apoptosis está llevada a cabo básicamente por la liberación del citocromo c y el factor inductor de apoptosis desde el espacio externo mitocondrial. El citocromo c tiene un efecto activador de las caspasas que ayuda a la ejecución final de la muerte celular programada. Otros factores importantes en el proceso de apoptosis son: la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en la mitocondria y la producción excesiva de ROS mitocondriales (del complejo I y III mayoritariamente), entre otros (Hancock y col., 2001a; Sudhandiran y Saha, 2003; Genestra y col., 2007; Kakkar y Singh, 2007).

En ciliados, la autofagia está ligada a la degradación de los núcleos durante la conjugación. En ocasiones los parásitos pueden llegar a emplear la autofagia de la célula hospedadora para estimular su invasión y crecimiento o la supresión de la misma para evitar su degradación (Duszenko y col., 2011).



La muerte celular programada en organismos unicelulares ha atraído un especial interés ya que diversos estudios han demostrado que muchos fármacos inducen la muerte vía apoptótica en parásitos a través de la mitocondria (Kakkar y Singh, 2007). Por ejemplo, el tratamiento con RESV afecta a la inclusión de la mitocondria en estructuras parecidas a los autofagosomas en *Philasterides dicentrarchi* (Morais y col., 2009) y el empleo de cloroquina (CQ) en *T. brucei* incrementa el número de autofagosomas por célula (Li y He, 2014).

### 6.5.- Funciones y regulación del calcio

El ión calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) es un elemento muy importante que interviene en multitud de funciones celulares así como en la muerte celular por apoptosis, pero en grandes cantidades puede resultar tóxico para las células. Una forma de almacenarlo para prevenir su toxicidad es en forma de depósitos, en vacuolas internas o en los acidocalcisomas.

En los protozoos Apicomplexa han sido caracterizados en detalle los acidocalcisomas (Moreno y col., 2011), constituyendo orgánulos de carácter ácido que probablemente contengan también los ciliados aunque no hayan sido caracterizados como tal por el momento, ya que los ciliados presentan un gran número de proteínas de unión y activación por  $\text{Ca}^{+2}$  particularmente en el córtex celular y en los cilios. En los ciliados *Paramecium* y *Tetrahymena* se han descrito depósitos de  $\text{Ca}^{+2}$  ácidos que participan en el tráfico de vesículas acoplado a las señales de  $\text{Ca}^{+2}$ . Además, los sacos alveolares de *Paramecium* también han sido identificados como reservorios de  $\text{Ca}^{+2}$  (Allen y col., 1993; Stelly col., 1995; Docampo y col., 2013).

En ciliados, gran variedad de procesos están regulados por  $\text{Ca}^{+2}$ , como la exo y endocitosis, el batido ciliar, la contracción celular y la migración del núcleo. Asimismo, el  $\text{Ca}^{+2}$  es esencial para la invasión intracelular parasitaria y también como mensajero secundario para el control de gran variedad de

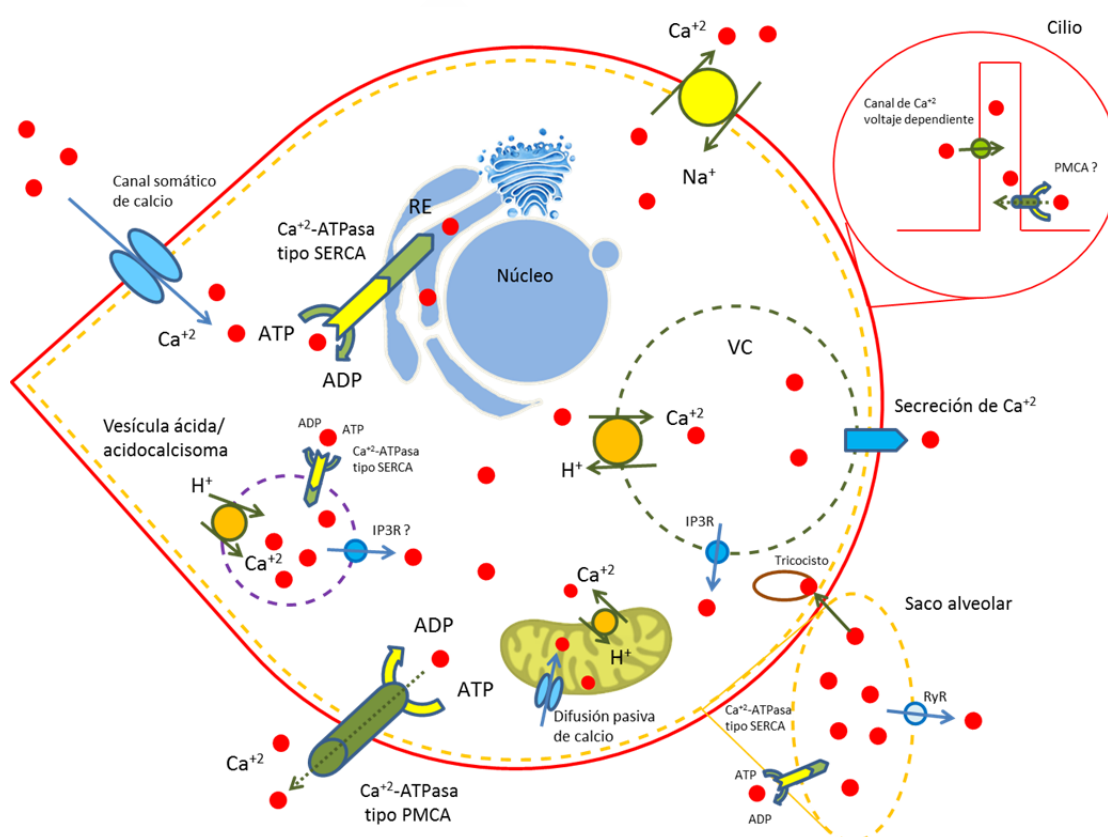
funciones celulares como la contracción, secreción, división celular y permeabilidad al sodio y potasio (Plattner y Klauke, 2001; Moreno y Docampo, 2003). El patrón de organización ciliar en *Paramecium* también depende del  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que sugiere una plasticidad morfogenética en el contexto de las señales de  $\text{Ca}^{+2}$  (Plattner y Klauke, 2001; Plattner y col., 2012). La redistribución del  $\text{Ca}^{+2}$  libre vacuolar durante el crecimiento de *P. falciparum* indica que este juega un papel importante en la morfogénesis parasitaria (Biagini y col., 2003).

Los acidocalcisomas, principales almacenes de  $\text{Ca}^{+2}$ , son orgánulos ácidos de origen lisosomal, caracterizados por poseer un pH ácido y un alto contenido en  $\text{Ca}^{+2}$  y fósforo, que puede estar presente en forma de PPi o polifosfatos (Poli P) y se encuentran en asociación con cationes de  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2/+3}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  (Docampo y col., 2013). Las principales funciones de estos orgánulos son el almacenamiento de cationes y fósforo para su participación en el metabolismo de PPi y Poli P y la osmorregulación, así como el mantenimiento y la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  y del pH intracelular, a través del cual modulan la autofagia (Docampo y col., 1995; 2013; Miranda y col., 2000; Docampo y Moreno, 2001a; 2008; 2011; Moreno y Docampo, 2009; Li y He, 2014; Patel y Cai, 2015). Además, se ha determinado la presencia en sus membranas de dos típicas bombas de protones: la pirofosfatasa vacuolar translocadora de protones ( $\text{V-H}^{+}\text{-PPasa}$ ) y la ATPasa vacuolar translocadora de protones ( $\text{V-H}^{+}\text{-ATPasa}$ ) (Hannaert y col., 2003). Los acidocalcisomas han sido descritos primeramente en tripanosomátidos, pero con posterioridad se han identificado en organismos tan diferentes como *Dictyostelium discoideum*, *Toxoplasma gondii*, y en bacterias, como *Agrobacterium tumefaciens*, por lo que se trata de un orgánulo bastante conservado a lo largo de la evolución (Marchesini y col., 2000; Seufferheld y col., 2004; Rohloff y Docampo, 2008; Docampo y col., 1995; 2008; 2013; Miranda y col., 2000; 2008). En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se

han descrito cuerpos de Poli P que poseen una  $H^+$ -PPasa y son similares a los acidocalcisomas (Ruíz y col., 2001).

La compartimentalización del  $Ca^{+2}$  es un proceso dependiente de energía. En protozoos, los dos sistemas implicados en su internalización en vacuolas y otros compartimentos intracelulares son la  $Ca^{+2}$ -ATPasa y el intercambiador  $Ca^{+2}/H^+$ , que se coordina con el intercambiador  $Na^+/H^+$ , enzimas que parecen estar bastante conservadas evolutivamente (Pittman, 2011). Las  $Ca^{+2}$ -ATPasas son bombas transportadoras con alta afinidad por  $Ca^{+2}$ , las cuales median el transporte eficiente en respuesta a pequeños cambios en los niveles de  $Ca^{+2}$  en el citosol. A su vez, estas bombas pueden subclasificarse en 3 tipos según su localización: bombas del retículo sarcoplásmico/endoplásmico, (SERCA), bombas de la ruta secretora en el aparato de Golgi, (SPCA/PMRI) y bombas de la membrana plasmática (PMCA), todas ellas muy parecidas estructuralmente, diferenciándose en su regulación y bioenergética (Pittman, 2011; Martínez-Higuera y col., 2013; Plattner, 2015a). Las  $Ca^{+2}$ -ATPasas se han localizado en parásitos como *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. gondii*, *D. discoideum*, *E. histolytica*, *L. donovani* y *T. vaginalis* (Mandal y col., 1997; Hauser y col., 1998; Docampo y col., 2005; Martínez-Higuera y col., 2013) y en el ciliado *P. tetraurelia*, en el cual se ha localizado en el RE y los sacos alveolares, dos de los principales almacenes de  $Ca^{+2}$  en el ciliado (Wright y Van Houten, 1990, Hauser y col., 1998, Plattner, 2015b). En otros parásitos, la  $Ca^{+2}$ -ATPasa relacionada con los PMCA de membrana se ha identificado también en acidocalcisomas y vesículas internas (Martínez-Higuera y col., 2013). A diferencia de las  $Ca^{+2}$ -ATPasas, los intercambiadores de  $Ca^{+2}$ , muestran baja afinidad por este ion, pero alta capacidad de transporte (Pittman, 2011). En los acidocalcisomas, la liberación de  $Ca^{+2}$  se produce a través de un receptor inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3R$ ) (Docampo y col., 2013).

En la membrana del ciliado *Euplotes crassus* y en *Paramecium* se ha localizado un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  que coopera en la regulación del  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel de la membrana plasmática con la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa (Burlando y col., 1999; Brini y Carafoli., 2011). En *Paramecium*, para la liberación del  $\text{Ca}^{+2}$  también se han identificado unos canales conocidos como CRCs localizados en los alveolos y diferentes vacuolas (**fig. 8**) y los receptores de rianodina (RyR) para la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel de los depósitos corticales (Plattner 2015a; b).



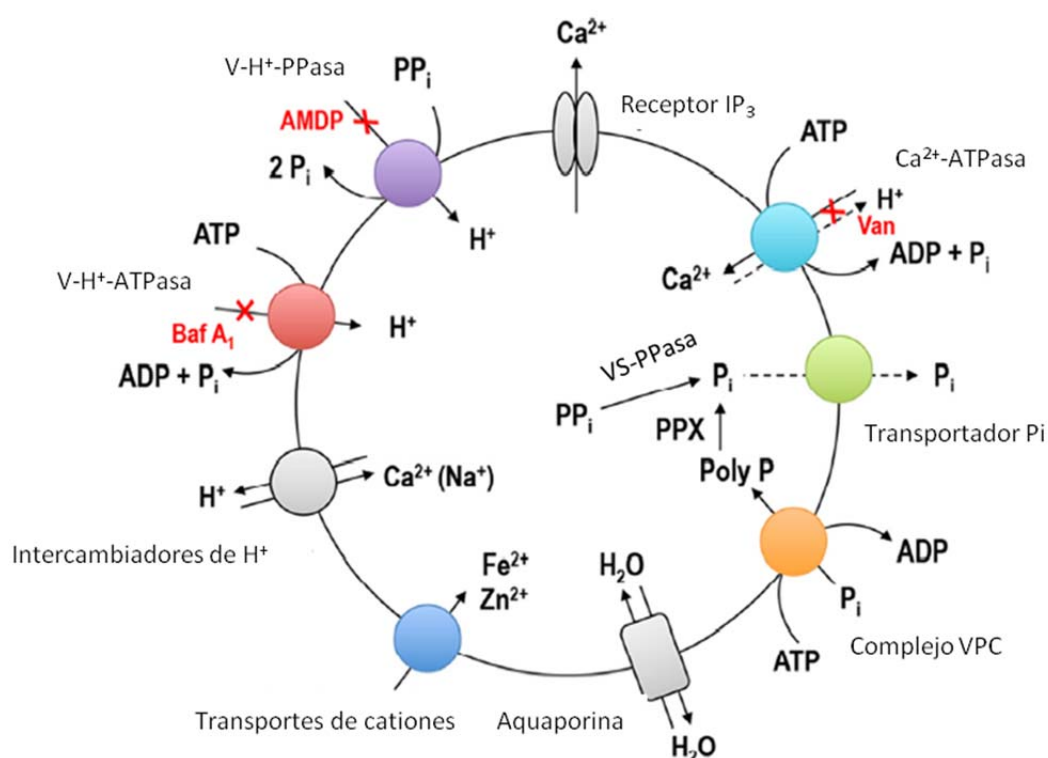
**Figura 8:** Esquema indicando el flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  en protozoos, así como las bombas y depósitos implicados. Modificado de Docampo y col., 2014; Plattner, 2014; 2015 a; b y Lourido y Moreno, 2015. Los puntos rojos simbolizan el  $\text{Ca}^{+2}$ . En *Paramecium* se han descrito varios tipos de CRCs en diversos orgánulos, para la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  que aquí no se muestran. VC: Vacuola contráctil, RE: Retículo endoplasmático.

#### 6.5.1.- Regulación de los niveles de $\text{Ca}^{+2}$ en los acidocalcisomas y vacuolas:

El pH ácido dentro de las vacuolas favorece la retención de  $\text{Ca}^{+2}$  y para que éste se libere es necesaria una neutralización (Bonansea y col., 2012). En el mantenimiento del pH generalmente intervienen diversas bombas como la  $\text{H}^+$ -PPasa, la  $\text{H}^+$ -ATPasa, los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$  y la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa (**fig. 9**) localizadas en la membrana de vacuolas y acidocalcisomas (Luo y col., 2001; Rodrigues y col., 2002. Docampo y col., 2005).

El ión  $\text{Na}^+$  también interviene en la regulación del pH de las vacuolas. Este ión interfiere a través de otro transportador, el de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que se activa bajo condiciones de osmolaridades altas y media la alcalinización de la vacuola seguida de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  ya que esta acoplado a otro transportador,  $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$  (**fig. 9**) (Vercesi y col., 2000; Bonansea y col., 2012). Este cotransportador se ha localizado en los acidocalcisomas de *L. donovani*, *T. brucei* y *T. gondii*, y en el ciliado *T. pyriformis* (Kramhøft y Jessen, 1992; Vercesi y col., 2000; Bonansea y col., 2012).

En *T. cruzi*, en condiciones de estrés hiperosmótico, se produce una activación del transportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de las vacuolas acídicas. Este transportador interviene en la alcalinización de estas vacuolas y se ha observado en diversos organismos que como consecuencia de la acumulación de  $\text{Na}^+$ , se produce un incremento en el volumen vacuolar (Bonansea y col., 2012). EL extremo C-terminal del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (**fig. 9**) reside en la vacuola y se sugiere que ahí se regula en función de cambios en el pH (Yamaguchi y col., 2005).



**Figura 9:** Representación esquemática de un acidocalcisoma y las enzimas localizadas en su membrana. Modificada de Docampo y Huang, 2015. Las  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasas están inhibidas por vanadato. La liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  se produce a través de un receptor inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). El gradiente de  $\text{H}^+$  establecido por  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar es inhibido por la bafilomicina A1 (Baf A1) y la  $\text{H}^+$ -PPasa vacuolar inhibida por el aminometiledfosfonato (AMDP). Existe una aquaporina que permite el transporte de agua. Están presentes otros transportadores (por ejemplo los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  o  $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$ ) y los transportadores para el  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , y el  $\text{PPi}$  inorgánico ( $\text{Pi}$ ) también probablemente esté presente. La translocación y síntesis del Poli P (poli P) tiene lugar a través de una chaperona de transporte vacuolar (VTC) a expensas de ATP. Los acidocalcisomas son ricos en  $\text{Pi}$ , poli P y cationes. También se han identificado una exopolifosfatasa (PPX) y una pirofosfatasa soluble vacuolar (VSPasa).

## 6.6.- PPasas inorgánicas

El  $\text{PPi}$  puede formarse espontáneamente bajo determinadas reacciones geoquímicas y podría haber precedido al ATP como molécula energética (Holm y Baltscheffsky, 2011; Kajander y col., 2013). Ello podría explicar su presencia en bacterias, protistas y plantas participando en reacciones enzimáticas y en mecanismos de transporte asociados a la membrana que utilizan  $\text{PPi}$  en vez de ATP. En los organismos actuales hay más de 200



reacciones en las que los nucleósidos trifosfato se convierten en nucleósidos monofosfato y PPi (Baykov y col., 2013). Tanto el PP inorgánico (PPi) como el ATP llevan a cabo funciones similares en cuanto a su capacidad energética se refiere. Se cree que el empleo de PPi como fuente de energía fue adquirido en la evolución anteriormente al ATP y la dependencia de sodio anteriormente a la dependencia de protones (Kajander y col., 2013). El PPi es elemental en el metabolismo celular actuando como donador de energía y regulador alostérico de muchas vías, ya que su concentración afecta al equilibrio de muchas reacciones moleculares en diversas rutas (Pace y col., 2011).

Entre las enzimas que utilizan PPi como fuente de energía están las pirofosfatasas de membrana ( $H^+$ -PPasas), las cuales han sido descritas en una gran cantidad de especies procariotas. Se trata de proteínas integrales de membrana que emplean la energía liberada de la hidrólisis del PPi en ortofosfato inorgánico (Pi), para transportar protones a través de la membrana en contra del gradiente electroquímico (Belgurov y Lathi, 2002). Recientemente, se han descrito también  $Na^+$ -PPasas (Luoto y col., 2011). Entre los eucariotas, todas las plantas y muchos protistas poseen pirofosfatasas translocadoras de protones, las cuales parecen estar ausentes en animales y hongos (Baykov y col., 2013).

#### *6.6.1.- Clasificación y funcionamiento de las PPasas*

Se han descrito 2 tipos diferentes de PPasas: integrales de membrana ( $H^+$ -PPasas) y las solubles o citosólicas; que a su vez pueden ser de 3 tipos: I, II y III (s-PPasas) (Pérez-Castiñeira y col., 2002b; Kajander y col., 2013). Las pirofosfatasas solubles son enzimas ubicuas que hidrolizan PPi para darle direccionalidad a las reacciones biosintéticas y para liberar calor; relacionadas con estas, están las pirofosfatasas mitocondriales (Lundin y col., 1991). Por otra parte, las PPasas de membrana emplean la energía obtenida de la hidrólisis en el movimiento de  $H^+$  para generar un gradiente electroquímico a

través de la membrana (Baltscheffsky y col., 1999; Pérez-Castiñeira, 2002a). Se diferencian también por su distinta respuesta a inhibidores como el fluoruro sódico (NaF) o los bisfosfonatos y también en los cationes divalentes que precisan para su funcionamiento,  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$  (Drozdowicz y col., 1999; Kajander y col., 2013, Gajadeera y col., 2015).

Englobando a las PPasas de membrana, otra clasificación se centra en la naturaleza de las bombas: si son bombas de  $Na^{+}$  o de  $H^{+}$ . El mecanismo hidrolítico se conserva pero cambia la especificidad del ión (Gajadeera y col., 1999; Kajander y col., 2013), aunque en un estudio reciente se propone que se trataría de la misma enzima y que esta, dependiendo de las condiciones del medio, presentaría mayor afinidad por estos iones (Luoto y col., 2013). Las bombas de  $Na^{+}$  solamente se han descrito hasta el momento en organismos procariotas.

#### 6.6.2.- Distribución de las $H^{+}$ -PPasas

La actividad PPasa fue descubierta por primera vez en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky y col., 1966) y posteriormente en plantas superiores (Karlsson y col., 1975), describiéndose más tarde su localización en las vacuolas (Rea y Poole, 1986) y más recientemente en acidocalcisomas de protozoos (Scott y col., 1998).

Las  $H^{+}$ -PPasas son proteínas integrales de membrana, altamente hidrofóbicas, que en el momento de su descubrimiento se pensaba que solamente existían en plantas superiores y ciertas bacterias fotosintéticas (Petel y Genraud, 1989). Sin embargo, desde entonces, han sido identificadas en un amplio rango de organismos, incluyendo procariotas extremófilos y protozoos parásitos de vida libre como los kinetoplastidos *Trypanosoma* y *Leishmania* y los apicomplejos *Plasmodium* y *Toxoplasma* (Scott y col., 1998; Luo y col., 1999; Rodrigues y col., 1999a; Hill y col., 2000; Pérez-Castiñeira y col., 2002b; Drozdowicz y col., 2003; Miranda y col., 2008; Sen y col.,



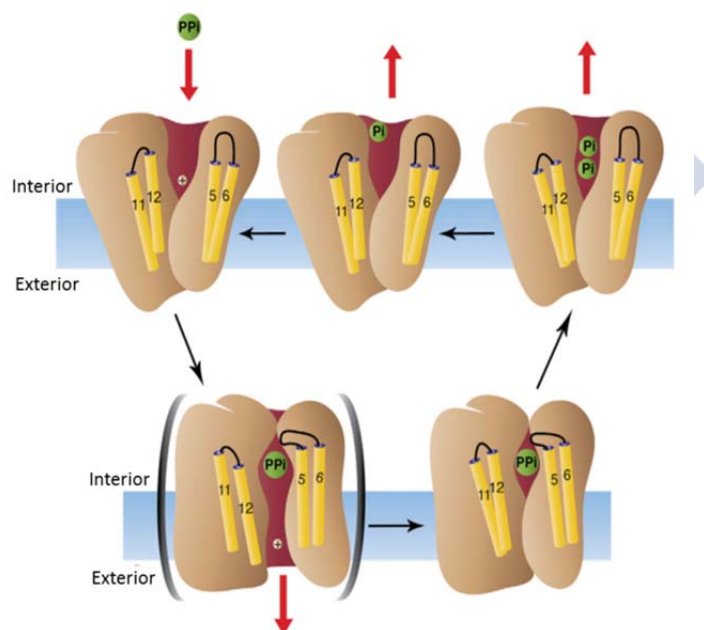
2009). Existe una clara evidencia para la amplia distribución de estas enzimas en ciliados de vida libre como *P. tetraurelia*, *Histriculus caviota* y *Vorticella microstoma*, así como en los ciliados anfitriónicos como *T. pyriformis* y parásitos ciliados como *Ichtyophthyrus multifilis* (Pérez-Castiñeira y col., 2002b); sin embargo, en ninguno de estos protozoos se ha caracterizado esta enzima. En la arquea metanogénica *Methanosarcina mazei* se han detectado en su genoma dos marcos abiertos de lectura (ORFs) para  $H^+$ -PPasas (Baümer y col., 2002).

Estas proteínas se encuentran, además de en la membrana vacuolar (tonoplasto), en la membrana plasmática celular en plantas (Rea y Poole, 1993; Long y col., 1995; Robinson y col., 1996). En protozoos, además de en los acidocalcisomas, también se ha descrito esta proteína en el aparato de Golgi, en la membrana de las vacuolas digestivas, en la membrana plasmática y en un compartimento de maduración vacuolar de tripanosomátidos (Harper y col., 2006). Sin embargo, las  $H^+$ -PPasas no existen en las membranas plasmáticas de los hospedadores de los parásitos (Rea y Poole, 1993) y ha sido demostrado que los inhibidores de estas enzimas, como los análogos del PPi (bisfosfonatos) presentan efectos antiprotozoarios, por lo que podría ser una diana para el futuro desarrollo de tratamientos quimioterapéuticos (Docampo y Moreno, 2008; Sen y col., 2009).

#### 6.6.3.- Estructura y regulación de las $H^+$ -PPasas

Las  $H^+$ -PPasas (EC 3.6.1.1) son proteínas homodiméricas de origen ancestral, tratándose de la clase de bombas primarias de iones más sencilla estructuralmente descrita hasta la actualidad (Maeshima y col., 2000; Drozdowicz y Rea, 2001), y para las que existe un alto grado de conservación entre proteínas homólogas de todos los organismos evolutivamente muy alejados que las poseen (Serrano y col. 2007). El sustrato de la enzima es un complejo  $Mg^{+2}$ -PPi del cual emplean la energía del enlace fosfoanhidro del

PPi para transportar  $H^+$  en contra de un gradiente electroquímico. El PPi o el  $H^+$ -PPi son inhibidores competitivos de la  $H^+$ -PPasa (Belogurov y Lahti, 2002; Saliba y col., 2002, Gaxiola y col., 2007). Se trata de proteínas hidrofóbicas relativamente grandes, con 15-17 segmentos  $\alpha$ -hélice transmembranales. Los modelos moleculares prevén su extremo N-terminal en el lumen vacuolar, mientras que el C-terminal se cree que se localiza en el citosol. Bioquímicamente se clasifican en dos grandes grupos, dependiendo de si su actividad catalítica es estimulada o no por  $K^+$  (poseen una lisina conservada, la cual está ausente en las  $H^+$ -PPasas dependientes de  $K^+$ ) (Maeshima y col., 2000; Drozdowicz y Rea 2001; Pérez-Castiñeira y col., 2001b). El sitio catalítico es el único que se parece a la estructura de las PPasas solubles y se propone el mismo mecanismo para las vacuolares y de membrana (**fig. 10**) (Rea y col., 1992b; Kajander y col., 2013).



**Figura 10:** Funcionamiento del sitio catalítico de una  $H^+$ -PPasa o  $Na^+$ -PPasa de membrana propuesto por Kajander y col., 2013. Según lo propuesto, el sustrato, PPi, se uniría al sitio catalítico, que se cerraría por el lado interno, liberando los cationes ( $H^+$  o  $Na^+$ ) al exterior. El sitio activo permanecería cerrado hasta que se hidroliza el PPi, momento en el que se abre de nuevo y se libera el Pi al interior. Modificado de Kajander y col., 2013.

Algunas plantas, protistas y procariotas poseen varias isoformas de  $H^+$ -PPasa que, aunque están estrechamente relacionadas, poseen una diferenciación funcional (Pérez-Castiñeira y col., 2001b; Drozdowicz y Rea, 2001; Segami y col., 2010). En *Arabidopsis thaliana* se han descrito dos tipos de  $H^+$ -PPasas, la AVP1 (tipo I), sensible a  $K^+$  y la AVP2 (tipo II) insensible a  $K^+$  (Drozdowicz y col., 2000). En *P. falciparum* también se han descrito dos tipos en función de su sensibilidad a  $K^+$ : PfVP1 y PfVP2 (McIntosh y col., 2001) al igual que en arroz, *Oryza sativa*, cacao, *Theobroma cacao*, vid, *Vitis vinífera*, remolacha, *Beta vulgaris*, cebada, *Hordeum vulgare* y tabaco, *Nicotiana tabacum*, además de varias isoformas de PPasas solubles en cacao, *Theobroma cacao*, y patata, *Solanum tuberosum* (Kim y col., 1994; Lerchl y col., 1995; Sakakibara y col., 1996; Rojas-Beltrán, y col., 1999; Drozdowicz y col., 2000; 2001; Venter y Groenewald, 2006; Motamayor y col., 2013). La PPasa de tipo II funciona como una bomba de  $H^+$  en el retículo endoplasmático de Golgi y está relacionada con vesículas en los tejidos jóvenes, aunque su contenido es mucho más bajo que el de la enzima de tipo I (Segami y col., 2010). En una investigación reciente, a través del estudio de la estructura tridimensional, se propone que las  $H^+$ -PPasas tipo I de plantas superiores y algas son homodímeros, mientras que las  $H^+$ -PPasas de tipo II y las de tipo I de bacterias y protozoos, son monómeros (Wang y col., 2013)

Englobadas en las  $H^+$ -PPasas, existen un subtipo de enzimas que se caracterizan por ser inhibidas por  $Na^+$ , al margen de su inhibición o activación dependiendo de la concentración de  $PPi$  y de iones  $K^+$ . Recientemente se ha definido una nueva subfamilia de  $H^+$ -PPasas de membrana que parcialmente retuvo sus patrones de regulación por  $Na^+$  y  $K^+$  de su precursor, la PPasa transportadora de  $Na^+$  (Scott y col., 1998; Luoto y col., 2015). Las  $Na^+$ -PPasas son dependientes de  $K^+$  y podrían preceder evolutivamente a las  $H^+$ -PPasas (Luoto y col., 2011).

También similares a las  $H^+$ -PPasas, las ectoPPasas, descritas por ejemplo en la membrana plasmática de *Leishmania amazonensis*, contribuyen a la supervivencia del parásito por la participación en el metabolismo del fosfato. Se ha descrito una enzima ectoPPasa que comparte algunas características en común con las  $H^+$ -PPasas. La actividad ectoPPasa resulta ser insensible al  $MnCl_2$ , pero altamente sensible al  $MgCl_2$ . Además, la hidrólisis extracelular de PPI es más eficiente a pHs alcalinos y sensible al NaF y al  $CaCl_2$ . Esta actividad fue mayor en fases de cultivo exponencial, lo que sugiere un posible papel de la enzima en el crecimiento del parásito (Freitas-Mesquita y col., 2014). En las formas epimastigotes de *Trypanosoma rangeli* también se identificó una  $H^+$ -PPasa en la membrana plasmática modulada de una forma muy similar. El pH óptimo para esta actividad PPasa es de 7,5 y el NaF bloquea su actividad. Esta enzima se muestra estimulada de una manera dosis dependiente por  $MgCl_2$  e inhibida por  $Ca^{+2}$ , a través de la formación de  $Ca_2PPI$  al competir éste con el  $Mg_2PPI$  (Rea, y col., 1992b; Gordon-Weeks y col., 1996). La actividad también decreció cuando se incrementó la proliferación celular *in vitro*. Además, su actividad parece estar modulada por la concentración de PPI extracelular, y se incrementó aproximadamente al doble cuando las células fueron mantenidas en medio de cultivo sin PPI (Fonseca de Souza y col., 2014).

#### 6.6.4.- Localización, funciones de las $H^+$ -PPasas y regulación de su expresión

Las  $H^+$ -PPasas integrales de membrana están presentes principalmente en las membranas de las vacuolas en plantas, y en los acidocalcisomas en protistas. Aparecen especialmente en especies en las que la limitación energética es frecuente y bajo condiciones de inanición y/o estrés abiótico (sequía, deficiencia de nutrientes, anoxia, estrés por frío, baja intensidad de luz, estrés por sal) incrementan su expresión para proveer un gradiente de  $H^+$  cuando escasea el ATP (Liu y col., 2010).

Las  $H^+$ -PPasas cumplen el papel fisiológico en las vacuolas de hidrolizar PPI de manera acoplada a la translocación de  $H^+$  hacia el interior del orgánulo. Este gradiente puede emplearse en el transporte secundario de iones como el  $Cl^-$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{+2}$ , fundamentales para mantener la presión osmótica y el pH adecuados, para el funcionamiento de las enzimas localizadas en ese compartimento (Baykov y col., 1994; Pérez-Castiñeira y col., 2001a). La presencia de la combinación de dos bombas de  $H^+$ , la  $H^+$ -ATPasa y la  $H^+$ -PPasa, en la vacuola digestiva de *P. falciparum*, es similar a la de las vacuolas de plantas, provocando la acidificación de la misma (Maeshima, 2001). De igual forma, en los acidocalcisomas de los tripanosomátidos, la  $H^+$ -PPasa tiene un papel similar al de las  $H^+$ -ATPasas, en la acidificación del interior del orgánulo (Docampo y col., 2013), lo que interviene en la supervivencia del parásito. La inanición y la autofagia química inducida, están acompañadas de la acidificación de los acidocalcisomas y el bloqueo de la acidificación por completo inhibe la formación de autofagosomas. En *Trypanosoma* se ha comprobado que bloqueando la biogénesis de los acidocalcisomas, se inhibe la autofagia (Li y He, 2014).

Empleando la metodología del ARN de interferencia, se ha contemplado que la  $H^+$ -PPasa de *T. brucei* no solo juega un importante papel en la regulación del  $Ca^{+2}$ , el Poli P, el contenido de  $H^+$  de los acidocalcisomas regulando el pH, sino que también es requerida para un crecimiento normal *in vitro* de las formas procíclicas (Lemercier y col., 2002).

La exclusión del exceso de  $Na^+$  del citoplasma y la acumulación de  $Na^+$  en vacuolas, son los principales mecanismos de las plantas al estrés por sal (López-Marqués y col., 2004). En *Solanum tuberosum* esto generalmente se lleva a cabo por transportadores transmembrana que excluyen iones  $Na^+$  del citosol y los cambian por  $H^+$ , un proceso dependiente de energía (Silva y Gerós, 2009). En situaciones de estrés inducido por la salinidad, la capacidad de compartimentalizar la sal en vacuolas es muy importante para mantener la

homeostasis celular. La actividad del transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , aumenta en condiciones de elevada salinidad, sugiriendo un papel de éste en la tolerancia a la sal, ya que la reducción de volumen está acompañada de la liberación de iones inorgánicos como el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  al medio. La actividad de este transportador está llevada a cabo, al menos en parte, por la fuerza motriz generada por la  $\text{H}^+$ -PPasa, la cual responde a la concentración de sal a nivel de regulación transcripcional y post-transcripcional, por lo que la actividad del transportador debe estar coordinada con la de la actividad de la  $\text{H}^+$ -PPasa, que le proporciona la fuerza motora para funcionar y cuya actividad también se ve incrementada (Maeshima, 2000; 2001; Fukuda y col., 2004; Silva y Gerós., 2009).

La hinchazón por ósmosis en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* es resultado de la alcalinización de los acidocalcisomas (Rohloff y Docampo, 2006). En respuesta a estrés hiposmótico se liberan iones  $\text{Na}^+$ , entre otros osmolitos y se produce un aumento en el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, (Docampo y col., 2013, Miranda y col., 2004), el cual varía según la osmolaridad del medio (Ruíz y col., 2001; Moreno y Docampo, 2009). Esta liberación de  $\text{Ca}^{+2}$ , en tripomastigotes de *T. brucei* es posible a través de un transportador de  $\text{Ca}^{+2}$ , acoplado al funcionamiento de un transportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Vercesi y Docampo., 1996).

## **7. Búsqueda de agentes quimioterapéuticos frente a la escuticociliatosis**

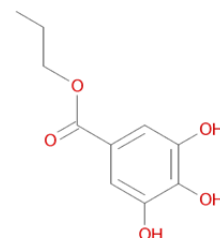
### **7.1. –Agentes antioxidantes**

Los antioxidantes se definen como cualquier molécula que retrase, prevenga o elimine daño oxidativo en una célula diana (Gutteridge y Halliwell, 2010). Pueden realizar su efecto en los sistemas biológicos por medio de diferentes mecanismos, incluyendo la donación de electrones

(actuando como agentes reductores), la quelación de iones metálicos (eliminando potenciales radicales libres), o a través la regulación de la expresión génica (Rathore y col., 2011). Este grupo de sustancias, las cuales actúan a bajas concentraciones, inhiben significativamente o retrasan el proceso oxidativo, mientras que son oxidadas ellas mismas. Los antioxidantes naturales pueden existir como enzimas, proteínas de alto peso molecular, o antioxidantes de bajo peso molecular. Ejemplos de ellos son el ácido ascórbico, el ácido úrico, y algunos polifenoles como el RESV (Young y Woodside, 2001; Rathore y col., 2011). Su empleo como aditivos está ampliamente distribuido en la industria para retardar, prevenir o eliminar el deterioro por oxidación.

#### 7.1.1.-Propil galato

El propil galato (E 310) es el éster del ácido gálico (3,4,5- ácido trihidroxibenzoico, PG, **fig. 11**). Es obtenido de forma sintética y empleado como antioxidante en alimentación, farmacéutica y cosmética y se considera GRAS (*Generally Recogniced As Safe*) (International Journal of Toxicology, 2007; Garrido y col., 2012; EFSA, 2014) aunque se están llevando a cabo estudios que investigan su posible toxicidad en diferentes organismos (Zurita y col., 2007; Hamishehkar y col., 2014). Debido a sus propiedades antioxidantes, su utilización se encuentra ampliamente extendida en la industria alimenticia para evitar la oxidación y el enranciamiento resultantes de la formación de peróxidos, especialmente en aquellos alimentos ricos en grasas y en comidas preparadas, aunque recientemente se han encontrado limitaciones en su uso (Bal y Tuner, 2014). El PG también posee propiedades antiinflamatorias y es un inhibidor específico de la ruta alternativa de la respiración mitocondrial (Siedow y Girvin, 1980; Jung y col., 2011). En



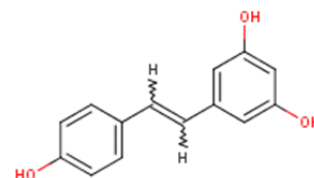
**Figura 11:**  
Estructura del PG.



parásitos se ha estudiado su efecto sobre la AOX de la CTE mitocondrial de *Cryptosporidium* y *Plasmodium* (Murphy y col., 1997; Roberts y col., 2004).

### 7.1.2.-Resveratrol

El resveratrol es un compuesto estilbenoide (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno, RESV, **fig. 12**) que es conocido desde los años 40, cuando fue aislado por primera vez de las raíces de la ballestera blanca (*Veratum album*) y después de *Polygonum*



*cuspidatum*, una planta medicinal. Está presente en cantidades importantes en muchas frutas comestibles como los frutos secos, las bayas o la piel de la uva. Desde un punto de vista botánico, el RESV actúa como una fitoalexina, un compuesto que es tóxico, producido por una planta en respuesta al ataque por parásitos u hongos o bajo condiciones de estrés. Se trata de un potente regulador de importantes procesos como el potencial de membrana, la transcripción de ADN, actividades enzimáticas, secreción, apoptosis, actividad mitocondrial y homeostasis de iones intracelulares, incluyendo la modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  (McCalley y col., 2014).

**Figura 12:** Estructura del RESV. Fuente: ChEMBL

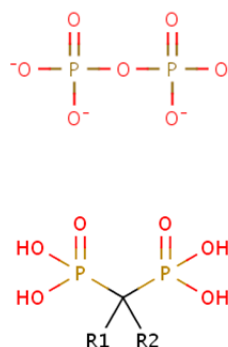
El RESV, así como otros polifenoles, tiene un efecto inhibitorio sobre *P. dicentrarchi* por mecanismos relacionados con la detoxificación celular (Leiro y col., 2004b). Inhibe el crecimiento de los ciliados *in vitro*, produce alteraciones en la mitocondria, inhibe el consumo de oxígeno, aumenta la vacuolización y además induce un alto nivel prooxidante, incrementando la producción de ROS y modificando la actividad de enzimas antioxidantes (inhibe la actividad catalasa, SOD y peroxidasa), induciendo estrés oxidativo y autofagia. Además, se ha observado que el RESV afecta a la vía clásica de la respiración mitocondrial (Lamas y col., 2009; Morais y col., 2009; 2013). Diversos estudios demuestran que el RESV puede actuar como antioxidante o

como prooxidante (Alarcón de la Lastra y Villegas, 2007; Muqbil y col., 2012). También posee propiedades antihelmínticas; la raíz del tubérculo de las especies del género *Carex* cuyo principal compuesto activo es el RESV, se ha utilizado durante mucho tiempo como un medicamento frente a las infecciones por helmintos intestinales en la región del noreste de la India (Giri y Roy, 2014). Asimismo se ha comprobado su efectividad frente a *Trichinella spiralis* (Ozcok y col., 2009). Dentro de las dianas sobre las que se ha identificado la actuación del RESV se encuentran las ciclooxygenasas y las lipooxygenasas, a las que inactiva al unirse a su sitio activo (Young y Woodside, 2001; Pirola y Fröjdö, 2008).

## 7.2.- Análogos del PPI

Los bisfosfonatos o ácidos bisfosfónicos, son análogos sintéticos del PPI en los cuales el puente de oxígeno entre los dos fósforos ha sido reemplazado por un carbono con varias cadenas laterales (**fig. 13**) por lo que podrían actuar como inhibidores de las enzimas que emplean PPI como sustrato. Se sintetizaron por primera vez en el año 1865 y su uso inicial fue el de anticorrosivo y desincrustante. Posteriormente, se descubrió que presentaban la propiedad de controlar la formación de fosfato cálcico en disolución así como la mineralización y reabsorción de hueso (Rodan y Fleisch, 1996). Muchos bisfosfonatos son potentes inhibidores de la reabsorción de hueso y se usan en prevención de osteoporosis, hipercalcemia y enfermedad de Paget, por ejemplo.

Entre los bisfosfonatos (que contienen una unión P-C-P no hidrolizable, en vez de una P-O-P, que contiene el PPI) los compuestos más activos, en



**Figura 13:** Estructura del PPI (a) y de los bisfosfonatos (b). Fuente: ChEMBL.

general, contienen un anillo aromático y un donador de unión a hidrógeno. El mecanismo de acción de los bisfosfonatos viene dado por la inhibición de la ruta isoprenoide y más específicamente la de la prenil-difosfato sintasa (Docampo y Moreno, 2001b; Moreno y Docampo, 2009) y se piensa que esto también produce cambios a nivel del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Rodan y Fleisch, 1996).

En diversos estudios se ha comprobado que actúan como inhibidores de la  $\text{H}^+$ -PPasa, tanto en plantas como la soja verde, *Vigna radiata* L., como en protozoos, como por ejemplo en *T. gondii*, en el cual el aminometilendifosfonato (AMDP), un bisfosfonato, es además capaz de desacoplar la replicación intracelular (Zhen y col., 1994; Gordon-Weeks y col., 1999; Docampo y Moreno, 2001b; Szabo y Oldfield, 2001; Drozdowicz y col., 2003).

Los bisfosfonatos que contienen nitrógeno se ha comprobado que son efectivos en la inhibición de *T. cruzi* *in vivo* e *in vitro* sin toxicidad para la célula hospedadora. Al igual que para el caso de *Toxoplasma*, en el que los bisfosfonatos inhiben el crecimiento parasitario, la fase ameba de *Dyctiostelium discoideum* también ve inhibido su crecimiento por la acción de estos compuestos (Rogers y col., 1994; Montalvetti y col., 2001).

Existen estudios que demuestran la capacidad antiparasitaria de estos compuestos como la inhibición por el risedronato sódico, un bisfosfonato, del crecimiento de *Cryptosporidium parvum*; el empleo de otro bisfosfonato, el pamidronato sódico, en la cura de la leishmaniosis cutánea en ratón (Docampo y Moreno, 2001b) y la proliferación intracelular de los amastigotes de *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo* (Urbina y col., 1999).

Algunos bisfosfonatos también se identificaron como inhibidores competitivos de la fosfofructoquinasa dependiente de  $\text{PPi}$  ( $\text{PPi}$ -PFK). Esta enzima resulta clave en el metabolismo de muchos parásitos, ya que es la enzima glicolítica limitante en protistas como *Entamoeba histolytica*, *Giardia*

*lamblia*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* o *Naegleria fowleri* (Byington y col., 1997).

Se ha postulado que los aminobisfosfonatos en tripanosomátidos y apicomplejos podrían acumularse preferencialmente en orgánulos con  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{PPi}$  presentes, los acidocalcisomas. Este orgánulo sería el equivalente al mineral del hueso por el que tienen alta afinidad los bisfosfonatos (Docampo y Moreno 2001b).

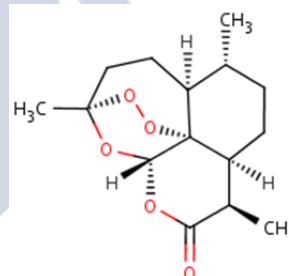
Por otra parte, se ha observado que los aminobisfosfonatos son capaces de estimular en ciertos casos la respuesta inmunológica del hospedador y la F.D.A. (*Food and Drug Administration*) ha aprobado su uso como un grupo atractivo de agentes quimioterapéuticos frente a enfermedades protozoarias (Docampo y Moreno 2001b).

### 7.3.- Agentes antimaláricos

#### 7.3.1.- Artemisinina

La artemisinina (3R,5aS,6R,8aS,9R,12S,12aR)-Octahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12H-pirano[4,3-j]-1,2-benzodioxepin-10(3H)-1, ART, **fig. 14**) es una lactona sesquiterpeno con un puente endoperoxido el cual se piensa que es el responsable del mecanismo de acción del compuesto, que intervendría en la formación de radicales libres. La ART es producida como

metabolito secundario por la herbácea anual *Artemisia annua* L., principalmente en la inflorescencia y hojas. Esta planta, también conocida como ajenojo anual, pertenece a la familia de las Asteraceae, es originaria de China, ha sido usada durante más de doscientos años en la medicina tradicional china para tratar la malaria y posee múltiples propiedades como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano, mediando además la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-10) (Kim y col.,



**Figura 14:** Estructura de la ART. Fuente:

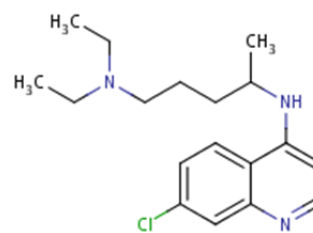
2015). La ART juega un rol central en el incremento de la resistencia a fármacos causada por el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*. Además de frente a la malaria, la ART y sus derivados resultan potencialmente efectivos frente a otras enfermedades parasitarias como la esquistosomiasis, aunque no es efectivo para todas las especies (Borrmann y col., 2001), así como frente a *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma*. Asimismo, se ha visto que la ART también posee propiedades antihelmínticas (Ekanem y Brisibe., 2010). Actúa destruyendo las células de los organismos parásitos a través de la generación de radicales libres de oxígeno altamente reactivos y la oxidación de proteínas y lípidos de las membranas, así como la inactivación de proteínas canal, ocasionando una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto una disfunción en la mitocondria (Golenser y col., 2006).

El principal sitio de actuación y acumulación de la ART es el retículo endoplasmático (Liu y col., 2010), aunque también se ha detectado la inhibición de las cisteína-proteasas de la vacuola digestiva y la producción de daños a nivel de la membrana vacuolar (Crespo y col., 2008). Por otra parte, en el ciliado *T. thermophila*, otro de los efectos que se ha percibido en derivados de la ART (artesanato y dihidroartemisinina) es la modulación del crecimiento (Shen y col., 2010).

Otro de los posibles mecanismos de acción que se ha propuesto para la ART es la inhibición de la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, por ejemplo en *P. falciparum* (Eckstein-Ludwig y col., 2003; Golenser y col., 2006; Shandilya y col., 2012); esto concuerda con la observación de una alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en *T. gondii* provocada por este compuesto (Nagamune y col., 2007).

### 7.3.2.-Cloroquina

La cloroquina ((RS)-N'-(7-cloroquinolina-4-yl)-N, N-diethyl-pentano-1,4-diamina; CQ, **fig. 15**), es un derivado de la quinina. Se ha venido empleando desde hace tiempo como tratamiento preventivo de la malaria, producida por *P.*



*falciparum*. Se acumula preferentemente en los lisosomas y en las vacuolas ácidas y acidocalcisomas, a los que entra por difusión simple; una vez allí, se protona ( $CQ^{+2}$ ) por lo que no puede salir e interfiere con procesos esenciales para la supervivencia del parásito, liberando ROS (López y Segura Latorre, 2008; Li y He, 2014), aunque también puede mostrar propiedades antioxidantes en función de su dosis (Herrerías-Gutiérrez y col., 1996; Tripathy y col., 2012).

**Figura 15:** Estructura de la CQ. Fuente: ChEMBL

En *P. falciparum* tratados con concentraciones subletales de CQ durante 36h, se observa una regulación positiva de la expresión de dos genes implicados en la acidificación vacuolar, la P-ATPasa y la V- $H^{+}$ -Pirofosfatasa II (Mwai y col., 2012); esta última podría estar implicada en la resistencia a CQ según datos de un reciente estudio, aunque es necesario realizar más investigaciones al respecto (Jovel y col., 2014).

# *Objetivos*

---





*Philasterides dicentrarchi* es un parásito histiófago emergente, causante de la escuticociliatosis en el rodaballo en cultivo, entre otras especies, que provoca actualmente enormes pérdidas en el sector de la acuicultura. La problemática de la escuticociliatosis se ve agravada por la inexistencia de tratamientos quimioterapéuticos, por lo que la búsqueda de dianas para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos efectivos y no tóxicos, tanto para el hospedador como para el consumidor humano, es esencial para abordar el control farmacológico de esta enfermedad. En la búsqueda de potenciales dianas farmacológicas efectivas, proponemos estudiar el papel de moléculas clave que participan en rutas metabólicas relacionadas con la obtención de energía por este protozoo. En primer lugar, evaluaremos la presencia de enzimas específicas que aparecen en organismos parásitos y que están asociadas a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, ya que la mitocondria es el orgánulo central encargado del metabolismo energético. A este respecto, la propuesta inicial de este estudio está basada en resultados previos que sugieren la posible existencia de una ruta alternativa de la respiración en este ciliado, en la que participaría una oxidasa terminal (AOX) que podría ser vital para su supervivencia en ambientes acuáticos microaerófilos y, adicionalmente, le podría servir también como mecanismo de adaptación bioquímica al parasitismo cuando este ciliado infecta al pez. La otra diana que proponemos es una enzima, la pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones ( $H^+$ -PPasa), que juega un importante papel en el metabolismo energético de muchos organismos, incluidas varias especies de protozoos parásitos, proporcionando un recurso termodinámico adicional al ATP para muchas reacciones biosintéticas, catalizando la hidrólisis del pirofosfato (PPi), un elemento crítico en el metabolismo celular, que actúa tanto como un donador de energía como un regulador alostérico en varias rutas metabólicas. Estas dos enzimas comparten las siguientes características:

a) aunque inicialmente se han descrito en hongos y plantas superiores, hoy se

sabe que existen también en varias especies de protozoos patógenos y de vida libre; b) están ausentes en los animales vertebrados y, por tanto, en su hospedador. En definitiva, una investigación sobre inhibidores de estas enzimas, nos proporcionaría información muy importante para desarrollar una nueva quimioterapia antiparasitaria frente a la escuticociliatosis del rodaballo evitando efectos adversos sobre su hospedador (el pez) y sobre los consumidores (el hombre).

Por todo ello, en el presente estudio nos hemos planteado **dos objetivos** principales

1. Investigar la posible existencia de una oxidasa terminal (AOX) insensible al cianuro en la cadena respiratoria mitocondrial del parásito escuticociliado *P. dicentrarchi*, con fin de realizar su caracterización, estudiar su actividad y sus variaciones de expresión bajo diferentes condiciones fisiológicas, y analizar el efecto de dos polifenoles con actividad antioxidante: el propilgalato y el resveratrol, sobre las rutas clásica y alternativa de la respiración, así como su posible efecto antiparasitario.
2. Comprobar la existencia de una  $H^+$ -PPasa en *P. dicentrarchi*, llevar a cabo su caracterización tanto bioquímica como funcional, investigando particularmente su papel fisiológico en la osmorregulación, el mantenimiento del pH y la regulación del calcio intracelular. Asimismo, nos propusimos estudiar el efecto antiparasitario de varios compuestos que podrían actuar a nivel de enzimas relacionadas con el metabolismo del pirofosfato y del  $Ca^{+2}$ , con el fin de demostrar que estas enzimas podrían suponer dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos frente a la escuticociliatosis.

# *Material y Métodos*

---



## **1. - Animales de experimentación**

### **1.1.- Rodaballos**

Rodaballos, *Scophthalmus maximus* (L.), de aproximadamente 50 g de peso, fueron obtenidos de varias piscifactorías en Galicia y distribuidos en tanques de 250 L con recircularización de agua de mar y aireación constante. Durante los experimentos, los peces se mantuvieron a una temperatura de 17-18 °C, bajo un fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad y se alimentaron diariamente con pienso comercial (Skretting, Burgos, España). Antes de dar comienzo a los experimentos, los peces se aclimataron previamente a las condiciones de laboratorio durante como mínimo 2 semanas.

### **1.2.- Ratones**

Se utilizaron ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad, obtenidos de Harlan OLAC Ltd. (Oxon, Inglaterra) e ICR (Swiss) CD-1 de 8-10 semanas de edad adquiridos de Charles River Laboratories (Barcelona).

### **1.3.- Bioética**

Todos los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo las directrices del Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos y la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio adoptado por el instituto nacional de salud (NIH). Todos los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité Institucional de cuidado y uso animal de la Universidad de Santiago de Compostela.

## 2.- Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados para la realización de este trabajo fueron de grado analítico y se adquirieron a Sigma-Aldrich excepto el PG (Fluka) y el bisfosfonato AMDP (Chemlin; Nanjing Chemlin Chemical industry Co, Ltd, China). Todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura, y las soluciones *stock* de los compuestos que se emplearon como tratamiento en los ciliados; AMA, SHAM, PG, RESV, CQ, ART y los bisfosfonatos, se disolvieron en DMSO y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

## 3.- Técnicas parasitológicas

### 3.1.-Parásitos

#### 3.1.1.- Ciliados: *Philasterides dicentrarchi*. *Cultivo e infecciones experimentales*

Los ciliados utilizados se obtuvieron en condiciones asépticas a partir líquido ascítico de la cavidad peritoneal de rodaballos con signos de escuticociliatosis en varias piscifactorías de Galicia (España) y el Algarve (Portugal) (cepa I1, Iglesias y col., 2001; cepas B1, C1, D2, D3, P1 y S1, Budiño y col., 2011) con fines comparativos. Los ciliados se obtuvieron en condiciones asépticas tal y como ha sido descrito previamente por Iglesias y col., 2001. Una vez aislados, los ciliados fueron cultivados a 21 °C en medio L-15 completo estéril (Leibovitz, PAA Laboratories GmbH, 10 % salinidad, pH 7.2) suplementado con 90 mg/L de adenosina, citidina y uridina, 150 mg/L de guanosina, 5 g/L de glucosa, 400 mg/L de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, 200 mg/L de Tween 80, 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) y 10 mL/L de una solución de antibióticos y antimicóticos (procedentes de una solución stock 100X y conteniendo una concentración final en el medio de

100 unidades/mL de penicilina G, 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina y 0,25 mg/mL de anfotericina B; Sigma-Aldrich), como ha sido descrito previamente por Iglesias y col., 2003a.

En los experimentos llevados a cabo en normoxia, los ciliados fueron cultivados en frascos de cultivos con tapas que permitan la ventilación. Para los experimentos en hipoxia, se burbujó argón durante al menos 10 min sobre el medio L-15 completo y a continuación se cerraron herméticamente los frascos que contenían los cultivos.

En los experimentos realizados para investigar el efecto de la salinidad, los ciliados fueron cultivados en soluciones salinas, a varias concentraciones, suplementadas con un 10% de FBS.

Con el propósito de mantener la virulencia de los ciliados, se realizaron infecciones experimentales cada 6 meses mediante inyección intraperitoneal de 200 µL de solución salina fisiológica (SSF; NaCl 0,15 M) estéril, conteniendo  $5 \times 10^5$  ciliados. Los ciliados se recuperaron del fluido ascítico como ha sido descrito previamente (Paramá y col., 2003; Leiro y col., 2008).

### 3.1.2.- *Apicomplejos: Plasmodium berghei. Infecciones experimentales y obtención del parásito.*

La cepa de *Plasmodium berghei*, (Vincke y Lips, 1978; ATCC® 50175™) se descongeló siguiendo las instrucciones de uso recomendadas por la ATCC, transfiriéndola a un baño a 35 °C, y se centrifugó a 300 x g durante 5 min, sustituyendo el sobrenadante (correspondiente al medio de congelación) por solución SSF. Para su propagación, se inyectaron los parásitos contenidos en la ampolla suministrada por la casa comercial en ratones ICR (Swiss) CD-1 de 8-10 semanas de edad (adquiridos en Charles River Laboratories, Barcelona) por vía intraperitoneal. Semanalmente, se extrajo sangre del seno venoso periorbital y se realizó la comprobación del

nivel de parasitemia tras la tinción de frotis de glóbulos rojos con una tinción hematológica (ver a continuación).

#### *3.1.2.1. - Tinción de glóbulos rojos*

Para la tinción de los frotis sanguíneos se empleó el colorante comercial Diff-Quick (IHCWorld) (Woodstock, EE.UU), una modificación de la tinción de Giemsa, siguiendo las instrucciones del fabricante. El frotis sanguíneo se dejó secar al aire y una vez fijado con metanol durante 30 segundos, se añadió el colorante durante otros 30 segundos. Se lavó con agua para eliminar el exceso de colorante y se deshidrató en etanol absoluto seguido del montaje y observación al microscopio óptico. Cuando la intensidad de infección era elevada (porcentaje de glóbulos rojos infectados (> 80 %) se procedió al sangrado completo de los ratones a través del plexo venoso retroorbital.

### **3.2.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Los ciliados ( $5 \times 10^6$  células) se recogieron por centrifugación a 1000 x g durante 5 min. Después de la fijación durante 12 h en glutaraldehído al 2,5 % (v/v) tamponado en cacodilato sódico a 0,1 M, pH 7,2 a 4 °C, los ciliados se lavaron dos veces con tampón cacodilato 0,1 M, cada uno de ellos de 4 min de duración. A continuación se post-fijaron con  $\text{OsO}_4$  al 1 % (p/v), en tampón cacodilato al 0,1 M durante 1 h a 4 °C y seguidamente se realizaron 3 lavados de 15 min con tampón maleato-NaOH 0,05 M a pH 5,2. Posteriormente las muestras se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 2 % en tampón maleato, pH 4,2, durante 2 horas a 4 °C. Tras una batería de deshidratación con acetona (5 min en cada uno de los siguientes: 25 %, 75 %, 95 %, y tres cambios en acetona al 100 %), las muestras fueron embebidas en una mezcla a partes iguales de acetona pura y resina Spurr y se dejaron en esa solución durante 12 h a 4 °C. La resina Spurr fue preparada conteniendo 10 g



de dióxido de vinilo ciclohexano, 7 g de resina epoxi, 26 g de nonenil anhídrido succínico y 0,4 g de 2-dimetilaminoetanol; Spi-chem) Transcurrido ese proceso, las preparaciones fueron embebidas en resina Spurr pura durante otras 12 h a 4 °C seguidos de otro cambio en resina fresca. Se vertieron sobre moldes de silicona y se dejó polimerizar la resina durante 12 h a 70 °C. Una vez endurecida la resina, se procedió al corte de las secciones semi-finas (0,5-1  $\mu$ M), con un ultramicrotomo (Reichert Ultracut E, Leica Microsystems AG, Alemania) y se tiñeron con azul de toluidina al 1% para su visualización al microscopio óptico y seleccionar una zona para realizar los cortes ultrafinos (60-80 nm). Estas secciones, depositadas en rejillas de níquel, se pre tiñeron con una solución alcohólica de acetato de uranilo (3 g en 100 mL de etanol de 30°) durante 10 min y tras lavarlas exhaustivamente con etanol de 30°, se realizó una tinción con citrato de plomo durante otros 10 min seguida de dos lavados, el primero con NaOH 0,02 M y el segundo con agua bidestilada. Posteriormente las rejillas se colocaron en la estufa a 37 °C para el secado de los cortes, y una vez secos, se procedió a su observación en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-2010 con un voltaje de aceleración de 120 kV (JEOL, Japón) (Paramá y col., 2006).

### **3.3.- Determinación de la actividad antiparasitaria en los ciliados**

La actividad inhibitoria del crecimiento del ciliado se realizó como hemos descrito con anterioridad (Iglesias y col., 2002), con modificaciones menores (Leiro y col., 2004). Se preparó una solución stock de cada compuesto a ensayar a una concentración de 100 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se mantuvo a -20°C en oscuridad hasta su uso. Para investigar el efecto sobre el crecimiento de los ciliados se añadió el compuesto a ciliados en cultivo en medio L-15 completo en placas de 25 pocillos (Corning)

conteniendo  $10^5$  ciliados/pocillo, posteriormente estas placas fueron incubadas durante 3 días a 21 °C.

El número de ciliados presente en los días 1, 2 y 3 desde el inicio de la incubación se cuantificó a partir de una alícuota de 25 µl extraída de cada pocillo del cultivo. Primeramente los ciliados fueron inactivados tras la adición de glutaraldehído a una concentración final de 0,25 % durante 15 min a temperatura ambiente, y después fueron contabilizado en un hemocitómetro (Iglesias y col., 2002). Se usaron 5 réplicas para cada experimento. Para descartar posibles efectos adversos del disolvente (DMSO), se incluyeron en cada experimento 5 réplicas de ciliados en medio L-15 completo con DMSO a la máxima concentración empleada (100 µM).

La estimación de la actividad inhibitoria del crecimiento del ciliado se realizó en base al cálculo de la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ). Para ello se empleó una correlación lineal  $y = mx + b$ ; donde  $m$  es la pendiente  $y_1 - y_2 / x_1 - x_2$  y  $b$  el valor de intersección de la línea empleando la ecuación  $IC_{50} = (0,5 - b) \times \log \text{ dosis} / m$ .

## 4.- Técnicas de Biología Molecular

### 4.1.- Purificación de ácidos nucleicos

El ADN de *P. dicentrarchi* se purificó con DNAeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN total de *P. dicentrarchi* fue obtenido a empleando el kit NucleoSpin ARN (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones de empleo a partir de  $10^7$  células/muestra.

Después de la purificación de ADN y ARN, la calidad, la pureza y la concentración se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.).

## 4.2.- Obtención de ADNc

El ARN se trató con DNAsa I, (libre de RNAsas, Thermo Scientific) y posteriormente se estimó su concentración final y pureza en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La síntesis de ADNc (25 µL/mezcla de reacción) se realizó mediante una reacción de retrotranscripción empleando cebadores aleatorios (*random hexamers*), a una concentración de 1,25 µM (Roche), 250 µM de cada uno de los deoxinucleosidos trifosfato (dNTPs), 10 mM de ditionitritol (DTT), 20 U de inhibidor de RNasa, 2,3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 200 U de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) (Promega) en tampón conteniendo 30 mM de Tris, 20 mM de KCl (pH 8,3) y 2 µg de muestras de ARN.

## 4.3.- PCR y RT-PCR

La PCR (para la amplificación de ADN y de ADNc) fue llevada a cabo con cebadores específicos de genes para la gen H<sup>+</sup>-PPasa del *P. dicentrarchi*: pareja de cebadores directo / reverso (FPiPh / RPiPh) 5'-CGGGACCAGAGGTATCTTTTA-3' / 5' ATTGATGTCAACGCCCCCTT-3'. Para el diseño y optimización de las parejas de cebadores se utilizó programa Primer 3Plus, basado en los parámetros predeterminados por el programa. Las mezclas de PCR (25 µl) contienen: tampón de reacción de PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 9.0), 0,2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTPs, NZYTech), 0,4 µM de cada cebador, 3 unidades de Taq polimerasa (ADN Taq polimerasa NZY, NZYTech, Portugal) y el volumen correspondiente a 50 ng de ADN genómico o 2 µL de ADNc. El volumen final de la mezcla de reacción se completó con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril conteniendo dietilpíerocarbonato (DEPC). Las reacciones se sometieron a una serie de ciclos de temperaturas en un termociclador automático (Biometra, Alemania) como sigue:

desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min seguidos de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 57 °C durante 45 s, y 72 °C durante 1 minuto; finalmente se realizó una fase de extensión de 7 min a 72 °C. El tamaño de los productos de PCR fue comprobado por electroforesis en gel de agarosa al 4 % y estos fueron enviados al servicio de secuenciación para comprobar la especificidad de la amplificación.

#### 4.4.- RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para la reacción de qPCR se emplearon 5 µL de la mezcla de reacción que ya contiene el tampón de ensayo y los dNTPs (Maxima SYBR green qPCR Master Mix; Thermo Scientific), la pareja de cebadores correspondientes al gen de estudio a una concentración final de 300 nM, 1 µL de ADNc, y el volumen necesario de H<sub>2</sub>O destilada libre de ARNasas, para alcanzar un volumen final de reacción de 10 µL/pocillo. Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 min, seguidas de 40 ciclos de 10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. Transcurrido este proceso, se continuó con el análisis de los productos obtenidos generando una curva de *melting* a 95 °C durante 15 s, a 55 °C durante 15 s, y a 95 °C durante 15 s. Adicionalmente, la especificidad y el tamaño de los productos de PCR obtenidos, se confirmaron por electroforesis en gel de agarosa al 4 %. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de PCR a tiempo real, Eco real-time PCR system (Illumina). La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó por el método de  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (Livak y Schmittgen, 2001) empleando el programa de conformidad MIQE (guías de mínima información para publicación de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real) (Bustin y col., 2009). Las secuencias de los cebadores empleados se describen la **Tabla 2:**

GEN	Nombre cebadores	Secuencia cebadores (directo/reverso)
$\beta$ -tubulina	F/R qTubpd	5'-ACCGGGGAATCTTAAACAGG-3'/5'-GCCACCTTATCCGTCCACTA-3'
H <sup>+</sup> -PPasa	F/R qPiph	5'-ATTGATGTCAACGCCCCC-3'/5'-TTTAAAGGGATCTCCAATGGT-3'
Hsp70	F/R qHsp70	5'-GCTATTGCCTACGGATTGGA-3'/5'-TTAAGGCTCTGGGGTTTCCT-3'

**Tabla 2:** Secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados en los ensayos de qPCR.

Las parejas de cebadores fueron diseñadas y optimizadas con el programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) con una temperatura de anillamiento de 60 °C.

#### 4.5. - RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*)

El ARN total del ciliado fue obtenido según se ha descrito con anterioridad y una vez tratado con ADNasa I, se purificó el poly A<sup>+</sup>-ARN a partir del mismo, empleando el kit de obtención de ARNm NucleoTrap mRNA mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm obtenido se analizó en cuanto a cantidad y pureza empleando el sistema de medición de A<sub>260</sub> en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-2000), como se ha descrito previamente. La técnica de RACE-PCR se empleó con la intención de obtener la secuencia completa del gen de codifica una pirofosfatasa translocadora de protones (H<sup>+</sup>-PPasa) en *P. dicentrarchi*, de la cual se poseía una secuencia parcial obtenida a través de la secuenciación masiva de ADN genómico mediante pirosecuenciación. La RACE-PCR fue llevada a cabo empleando el kit Clontech SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories Inc., EE.UU) de acuerdo con las instrucciones aportadas por el fabricante (Mallo y col., 2015).

La PCR se realizó utilizando unos cebadores específicos, diseñados para la secuencia parcial del gen de la pirofosfatasa de *P. dicentrarchi* (directo/reverso: 5'-GATAACGCTGGAGGAATTGC-3'/5'-GACGAAGGGAGTTCCGAGGA-3'). Estos cebadores fueron diseñados y optimizados empleando el programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) basándose en los parámetros que utiliza el programa por defecto. La reacción de RACE-PCR se llevó a cabo del siguiente modo: 5 ciclos de 30 s a 94 °C y 3 min. a 72 °C, seguidos de 5 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 3 min a 72 °C y finalmente 5 ciclos durante 30 s a 94 °C, 30 s a 68 °C y 3 min a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados a partir de un gel de agarosa al 1% realizado en tampón de electroforesis modificado, tris acetato etilendiamina-tetra-acético (TAE; tris –acetato 40 mM, pH 8, EDTA-Na<sub>2</sub> 0,1 mM) conteniendo bromuro de etidio (EtBr) a una concentración final de 0,5 mg/mL. Las bandas de ADN obtenidas, por los extremos 3' y 5' se recortaron del gel con ayuda de un bisturí y un transiluminador y se purificaron por centrifugación empleando unos filtros de ultrafiltración (MicroconPCR, Millipore, EE.UU) antes de su envío al servicio de secuenciación utilizando el método de Sanger (Sistemas Genómicos, España).

## 5.- Técnicas inmunológicas

### 5.1- Producción antígenos, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos

#### 5.1.1.- Extracción de proteínas totales de *P. dicentrarchi*

Para el análisis de proteínas totales, un pellet de  $3 \times 10^6$  ciliados fue resuspendido en 100  $\mu$ L de tampón reductor conteniendo 62 mM Tris-HCl, pH 6,8, un 2 % dodecilsulfato sódico (SDS), 10 % glicerol, 0,02 M ditiotreitolo

(DTT) y 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) e incubado a 100 °C durante 5 minutos. Para la caracterización de las proteínas nativas, se emplearon muestras preparadas en tampón no reductor, que posee la misma composición que el tampón reductor excepto que carece de DTT y las muestras no se sometieron al tratamiento con calor.

#### 5.1.2.-Extracción de proteínas de membrana de *P. dicentrarchi*

Las proteínas del ciliado asociadas a membrana (MAP) fueron extraídas por separación de fases en una solución de Triton X-114 (Bordier, 1981), mediante el método previamente descrito por Iglesias y col., 2003b, con pequeñas modificaciones. Las células ( $10^7$ ) fueron resuspendidas en 1 mL de tampón Tris (tris(hidroximetil)aminometano)– HCl 10 mM frío, a pH 7,5, al que se le añadió 1 mL del tampón de extracción también frío, conteniendo NaCl 300 mM, Tris–HCl 20 mM, pH 7,5 y Triton X-114 al 2 %. Se eliminaron los elementos pertenecientes al citoesqueleto que quedaron en el pellet mediante centrifugación a 16000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se calentó a 37 °C durante 5 min. Al final del proceso, la solución presentó un aspecto de nube debido a la condensación del detergente. La muestra se dividió en tubos Eppendorf de 0,5 mL (200 µl/tubo) conteniendo cada uno de ellos 300 µl de una solución de sacarosa (sacarosa 6%, NaCl 150 mM, Tris–HCl 10 mM, pH 7,5 y Triton X-114 al 0,06%). Seguidamente, el detergente y las fases acuosas fueron separados por centrifugación a 300 x g, durante 5 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes resultantes de cada tubo fueron extraídos cuidadosamente y mezclados en tubos Eppendorf de 1,5 mL. El proceso de extracción fue repetido una vez más añadiendo a la mezcla acuosa la cantidad suficiente de Triton X-114 para obtener una concentración final de 0,5 % de este. La mezcla se calentó a 37 °C, 5 minutos, y después de la condensación micelar, se distribuyó en tubos Eppendorf conteniendo una solución de

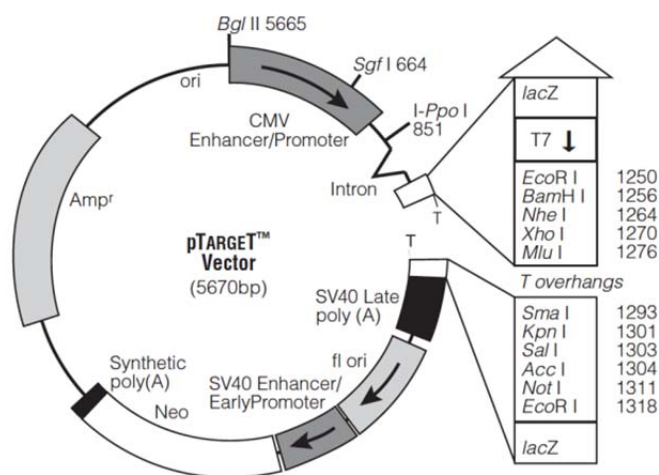


sacarosa 0,2 M en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) y la fase de detergente separada en la primera extracción. Los tubos se centrifugaron a 300 x g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, el sobrenadante se descartó y las proteínas contenidas en la fase del detergente se precipitaron por la adición de 9 volúmenes de acetona fría, seguidamente se resuspendieron por vórtex y se incubaron durante 30 min en hielo. Las proteínas de membrana precipitadas, se recogieron por centrifugación a 16000 x g durante 15 min a 4°C y el pellet se secó en un concentrador por vacío (MiVac, GeneVac, UK). Finalmente, los extractos obtenidos fueron resuspendidos en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, y guardados a -80 °C hasta su empleo posterior.

#### 5.1.3.- Construcciones plasmídicas para producción de vacunas de ADN.

El ADN de *P. dicentrarchi* fue obtenido como se ha descrito con anterioridad. Una secuencia parcial del gen de la H<sup>+</sup>-PPasa se amplificó por PCR usando la pareja de cebadores diseñados y optimizados con el programa Primer 3 Plus (directo/reverso; (FPiph/RPiph) 5'-CGGGACCAGAGGTATCTTTTA-3' / 5'-ATTGATGTCAACGCCCCC-3'). La PCR inicialmente se desarrolló tal y como se ha descrito previamente y los productos de PCR se purificaron empleando un gel de agarosa al 1% en tampón de electroforesis TAE modificado (40 mM Tris-acetato, pH 8, 0,1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>) conteniendo EtBr (0,5 mg/ml). La banda de ADN se recortó del gel con la ayuda de un transiluminador, y se purificó con el empleo de un filtro de purificación de ADN a partir de geles de agarosa (MicroconPCR, Millipore, EE.UU). Una vez purificado el producto de PCR, se clonó en el vector *pTarget<sup>TM</sup>-Mammalian Expression Vector System* (Promega, EE.UU) (**fig. 16**) usando las instrucciones del kit suministradas por el fabricante. Se transformaron células de *Escherichia coli* (cepa JM109) y seleccionaron en base a su sensibilidad a ampicilina (Amp) y su color, y el ADN plasmídico

fue purificado empleando el sistema *Endo Free Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones de uso del kit. El ADN plasmídico purificado fue clonado y testado por secuenciación e inyectado en ratones como se describe posteriormente.



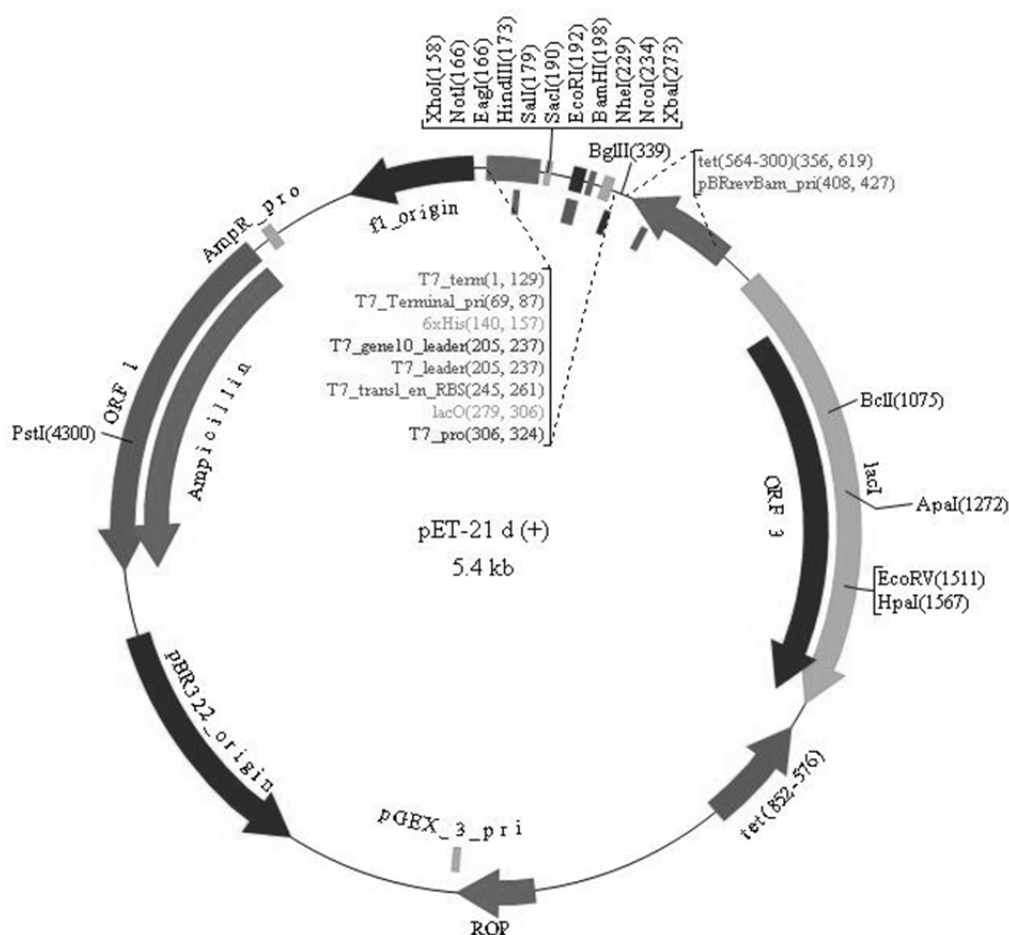
**Figura 16:** Mapa esquemático del vector pTarget. Promega

#### 5.1.4.- Producción proteínas recombinantes en vector pET21d.

El ARNm de *P. dicentrarchi* fue extraído a partir de  $5 \times 10^6$  ciliados siguiendo el mismo método que se ha descrito con anterioridad. Una secuencia parcial del gen de la  $H^+$ -PPasa fue amplificado por RT-PCR empleando los cebadores (con sitio de corte) directo: 5'-CCCGAATTCCGGGACCAGAGGTATCTTTTA-3' (EcoRI) y reverso: 5'-AAGGGGGCGTTGACATCAATGCGGCCGCAAA-3' (Not I) siguiendo el método descrito anteriormente. El producto de PCR purificado fue clonado en el vector de expresión pET-21d (Promega, EE.UU.) (**fig. 17**) y transformado en las células de *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo los protocolos estándares. Los clones positivos fueron confirmados por secuenciación nucleotídica. La expresión en los cultivos en fase logarítmica fue inducida con diferentes concentraciones de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (0,5, 1,0, 1,5, y 2,0 mM) en medio Luria Bertani (LB; conteniendo triptona 10 g/L, extracto

de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7) y revisado cada hora en un intervalo de 5 horas. Para identificar la localización de la proteína recombinante, la suspensión celular fue sometida a sonicación y el lisado celular resultante fue centrifugado a 11000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante clarificado y el pellet obtenido fueron recogidos por separado y analizados por electroforesis SDS-PAGE del mismo modo que se describirá con posterioridad.

Los clones recombinantes de las células BL21 (DE3) vieron inducida su expresión a través del empleo de una solución de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, (IPTG) 1 mM a 37 °C durante 7 h en medio LB conteniendo 50 µg/mL de Amp.



**Figura 17:** Esquema del vector pET-21d (Promega).

Cuando la OD<sub>600</sub> del cultivo alcanzó un valor aproximado de 0,6, el pellet celular fue resuspendido en 5 mL de tampón de lisis celular MCAC-0 (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, 10 % v/v glicerol y 1 mM PMSF) y se le añadieron 50 µL de un cóctel inhibidor de proteasas 100x (Promega). Inicialmente, la muestra fue disgregada por ultrasonidos durante 3 ciclos de 5 pulsos de 1 min a 60 W en un equipo W-250 *Sonifier* (Branson Ultrasonic Corporation) y después sometida a 3 ciclos de refrigeración a -70 °C y descongelación en hielo añadiendo 0,05 mL de 1 M Mg Cl<sub>2</sub> y 0,05 mL de una solución de DNasa I. Tras incubar 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 11000 x g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue analizado por SDS PAGE.

La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad usando una columna precargada de níquel, *Ni Sepharose Histrap Column* (GE Healthcare Life Sciences) en un sistema de cromatografía líquida *ÄKTAprime Plus* (GE Healthcare Life Sciences). Inicialmente, la columna fue equilibrada con 5 mL de tampón de unión (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) y posteriormente, la unión de la proteína a la columna fue eliminada haciendo pasar 15 mL del tampón de elución (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4). Cada fracción eluida fue recogida en alícuotas de 1 mL con un colector de fracciones, y analizada por electroforesis SDS-PAGE al 12,5 %. Las fracciones de proteína purificada fueron dializadas toda la noche frente a agua destilada y luego concentradas empleando un sistema de concentración por centrifugación *Amicon Ultra Centrifugal Filter Device* (Millipore, EE.UU) con un poro de membrana de 10 kDa. La concentración final de la proteína se estimó por el método de Bradford empleando un reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bradford, 1976).

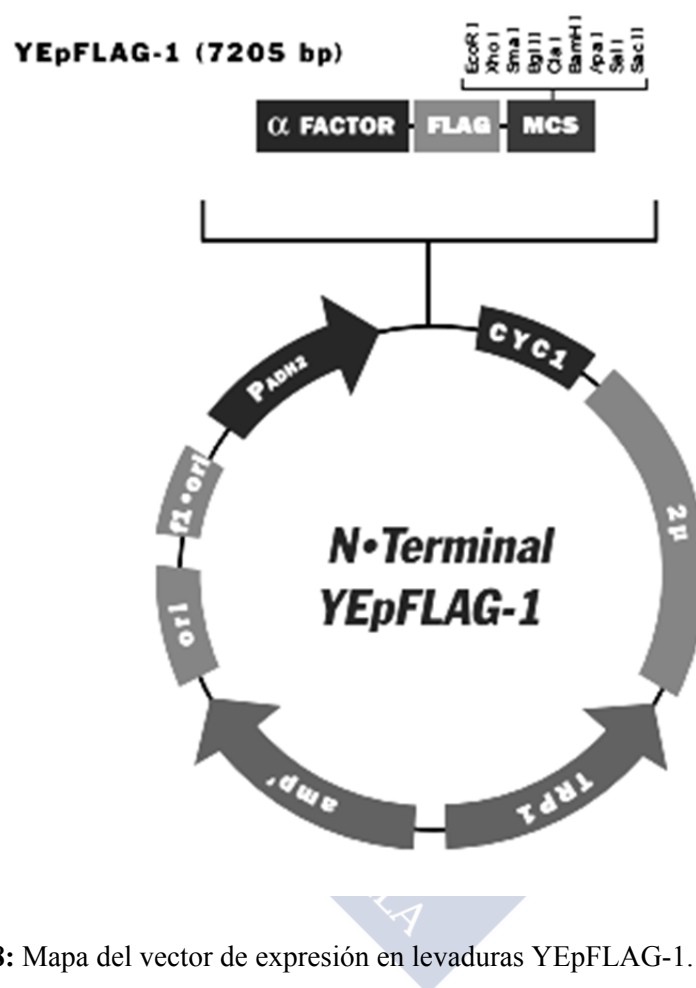
### 5.1.5.- Producción de proteínas recombinantes en levadura

El ADNc de *P. dicentrarchi* fue obtenido tal y como se ha descrito previamente y la PCR se realizó con los cebadores específicos diseñados para una secuencia parcial de la pirofosfatasa translocadora de electrones de *P. dicentrarchi* (pareja de cebadores directo/reverso 5'-AAAGAAGAAGGGGTACCTTTGGATAAAAGAattgatgtcaacgccccctt-3'/5'-

TGGGACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGTGGgggaccagaggtatctttta-3'). Estos cebadores fueron diseñados y optimizados empleando la base de datos del genoma de *Saccharomyces*, disponible en (<http://www.yeastgenome.org/>), incluyendo la región de hibridación con el plásmido de levaduras YEpFLAG-1 (Eastman Kodak Company) y la cola de histidinas, región poly-His (las letras en minúscula se corresponden con la zona de anillamiento del gen). La reacción de PCR se desarrolló inicialmente a 95 °C durante 5 min, y después de 30 ciclos de 94 °C, 1 min, 55 °C, 1.5 min y 72 °C, 2 min, una fase de extensión a 72 °C, 7 min. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit de purificación *Gene Jet PCR Purification Kit* (Fermentas, Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR purificados, fueron clonados en el vector de expresión de levaduras YEpFLAG-1 (Eastman Kodak Company) (**fig. 18**). Este vector contiene un plásmido que contiene un gen (TRP1) que completa la auxotrofia por el triptófano de la célula hospedadora (López-López y col., 2010). El plásmido YEpFLAG-1 una vez linearizado por digestión con el enzima *EcoRI* y *Sall* (Takara) fue empleado para transformar células de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa BJ 3505) por el procedimiento del acetato de litio (Ito y col., 1983). Las colonias positivas fueron seleccionadas usando medio completo sin triptófano (CM-Trp) conteniendo glucosa (20 g/L), medio

*Yeast Nitrogen Base* (YNB) sin aminoácidos (Sigma-Aldrich), adenina (40 mg/L) y los aminoácidos (histidina, leucina, tirosina, 40 mg/L de cada uno; arginina, metionina, treonina 10 mg/L de cada uno; isoleucina y fenilalanina 60 mg/L y 40 mg/L, respectivamente).



**Figura 18:** Mapa del vector de expresión en levaduras YEFLAG-1. Sigma-Aldrich

El ADN plasmídico fue entonces extraído empleando *Easy Yeast Plasmid Isolation Kit* (Clontech) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante y el fragmento de ADN purificado fue analizado por secuenciación (Sistemas Genómicos, España).

La proteína recombinante de *P. dicentrarchi* fue purificada desde los cultivos celulares de *Saccharomyces cerevisiae* después de 72 horas de crecimiento en medio modificado de expresión de alta estabilidad plasmídica (*Yeast Peptone High Stability Expression Medium* (YPHSM)) conteniendo 1

% de glucosa, 3 % de glicerol, 1 % de extracto de levadura, y un 8 % de peptona, a 30°C en matraces Erlenmeyer rellenos aproximadamente con un 20 % de su volumen con medio de cultivo y en agitación a 250 rpm (López-López, y col., 2010). Como inóculo se empleó un volumen adecuado de un pre-cultivo para obtener una OD<sub>600</sub> inicial de 0,1. La suspensión celular fue centrifugada a 7500 x g durante 15 minutos y el sobrenadante clarificado fue purificado por una cromatografía de afinidad en una columna precargada de níquel-sefarosa, *Ni-Sepharose Histrap column (ÄKTAprime plus, GE Healthcare Life Sciences)*.

Inicialmente, la columna se equilibró con 25 mL de tampón de unión (20 mM fosfato sódico, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4). Después del equilibrado de la columna, se cargaron 100 mL de medio de cultivo, a un flujo de 0,5 mL/min y finalmente, la proteína retenida en la columna se eluyó con tampón de elución (20 mM fosfato sódico, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4). Se recogieron fracciones del eluido y se analizaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5 % y paralelamente se dializaron durante toda la noche en agua bidestilada. La muestra dializada se concentró con un filtro Amicon ultra (Millipore, EE.UU) con un tamaño de poro de 10 kDa. La concentración proteica final se calculó a través del ensayo de Bradford (Bradford, 1976) empleando un reactivo comercial (Bio-Rad Protein Assay).

#### 5.1.6.- Síntesis péptidica

Se encargó la síntesis química de un péptido con 17 aminoácidos, correspondiente con el dominio (PAB<sub>HK</sub>, HKAAVIGDTIGDPLKDT) de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi* y se conjugó con *keyhole-limpet hemocyanin* (KLH), una proteína carrier, con la finalidad de asegurar el máximo nivel de inmunogenicidad (ProteoGenix, Francia). El aminoácido cisteína fue añadido a la secuencia para permitir su conjugación con el KLH. El péptido fue sintetizado y conjugado con el KLH por acoplamiento sulfo-SMCC a un



rendimiento de 10-20 mg teniendo una pureza mayor del 85 %; posteriormente fue liofilizado y almacenado a -20 °C hasta su uso.

#### 5.1.7.- Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteínas en las muestras fue determinada mediante el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo comercial *BioRad Protein Assay* (BioRad Laboratories, Alemania). Para la cuantificación, se construyó una recta de calibrado con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich).

### 5.2.- Inmunizaciones y obtención de los sueros policlonales

#### 5.2.1.- Inmunización genética

Inicialmente un grupo de 5 ratones BALB/c fueron anestesiados previamente por inyección intraperitoneal (i.p.) con 30 µL de una mezcla de 0,4 mL de 100 mg/mL de ketamina y 0,1 mL de 20 mg/ml de xilacina. La inmunización genética se realizó inyectando en el cuádriceps de ratón a 0,5 cm sobre la rodilla, 0,2 cm de profundidad y una ángulo de 30°, con la ayuda de una jeringuilla de tuberculina provista de una aguja de 28G (Becton Dickinson, EE.UU) un volumen de 50 µL de solución salina (0,9 % NaCl, estéril) conteniendo 50 µg del plásmido puro obtenido empleando el *Qiagen Plasmid Maxi kit* (Qiagen) y 50 µL de solución salina conteniendo 0,4 % azul de tripano. Transcurridos 30 días, los ratones fueron reinmunizados con la misma dosis de plásmido y por la misma vía.

#### 5.2.2.- Inmunización con proteínas/péptidos

Los ratones se inmunizaron intraperitonealmente, con 200 µL de una dilución 1:1 (v/v) de la mezcla con adyuvante completo de Freund (ACF; Sigma–Aldrich) y 500 µg de la proteína recombinante de levaduras purificada o con 400 µg del péptido (PAB<sub>HK</sub>). Los ratones empleados en este caso fueron

de la cepa ICR (Swiss) CD-1, dos grupos de 5 ratones para cada preparación antigénica. Estas mismas dosis en adyuvante incompleto de Freund se volvieron a inyectar a los 15 y 30 días tras la primera inmunización.

#### 5.2.3.- Obtención del suero

Para la obtención del suero inmune, los ratones inmunizados se sangraron vía plexo venoso retrobulbar 7 días después de la segunda reinmunización (Piazzón y col., 2011). La sangre obtenida se dejó coagular durante 2 h a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4 °C. Tras la coagulación, el suero se extrajo mediante centrifugación a 2500 x g durante 5 min a 4 °C y se almacenó a -20 °C diluido 1:1 en glicerol hasta su uso.

### 5.3.- Inmunoensayos

#### 5.3.1.- Determinación de los niveles de anticuerpos en el suero

##### 5.3.1.1.- ELISA

Para la titulación inicial de los sueros de los ratones inmunizados con antígenos de membrana (MAP) o totales de *P. dicentrarchi* obtenidos como se ha descrito con anterioridad, se empleó un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) indirecto, como se ha descrito previamente (Sanmartín y col., 2008). El antígeno se resuspendió en tampón de acoplamiento (carbonato-bicarbonato, pH 9.6), a una concentración de 20 µg/mL. A continuación, se añadió a una microplaca de ELISA de 96 pocillos (Iwaki, Japón), 100 µL de la muestra por pocillo y la placa se incubó durante toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron posteriormente 3 veces con TBS (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) y se bloquearon durante 1 hora con TBS conteniendo 0,2 % Tween 20 (TBS-T) y 5 % de leche descremada en polvo. Seguidamente, se incubaron con 100 µL de diferentes diluciones del suero a estudio en TBS-T conteniendo 1 % de leche en polvo descremada durante 30 min en agitación a 750 rpm a temperatura ambiente y se lavaron durante 5

veces con TBS conteniendo 0,05 % de Tween 20. Posteriormente, se incubó durante 30 min hora a temperatura ambiente con una dilución 1:1000 de un anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón acoplado a peroxidasa (Dakopatts), en TBS-T y en agitación. Tras realizar de nuevo 5 lavados con TBS, se añadieron 100  $\mu$ L de ortofenilendiamina (OPD) a una concentración de 0,04 % en tampón fosfato-citrato pH 5 conteniendo 0,001 % de  $H_2O_2$ . La reacción se detuvo tras la incubación con OPD durante 20 min en oscuridad empleando 25  $\mu$ L de una solución 3 N de  $H_2SO_4$ . Finalmente, se midió la densidad óptica a 492 nm en un lector de placas ELISA (*Labsystem Multiscan RC*, Labsystems S. A. C., Finlandia).

### 5.3.2. – Immunoblot / Western blot

#### 5.3.2.1. - Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles lineares de una concentración de poliacrilamida del 12,5 % (Piazzón y col., 2008). Los geles, una vez finalizada la electroforesis, se tiñeron con azul de Coomasie, *Thermo Scientific GelCode Blue Safe Protein Stain* (Thermo Fisher, EE.UU) para determinar cualitativamente la concentración de proteína de cada muestra.

#### 5.3.2.2.- Western blot

En los ensayos de Western-blot, se transfirieron las proteínas separadas en SDS-PAGE a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF), a 15 V durante 35 min (0,45  $\mu$ m; Millipore, USA) en un equipo de electrotransferencia, trans-blot SD transfer cell (Bio-Rad, EE.UU). Las membranas fueron embebidas en tampón de transferencia conteniendo 48 mM Tris, 29 mM glicina, 0,037 % SDS y 20 % metanol, pH 9,2 y se tiñeron con el colorante Ponceau S para verificar la transferencia. A continuación, se bloquearon durante 1,5 h a temperatura ambiente con un tampón Tris salino (TBS; 50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) conteniendo un 0,2 % Tween 20 y

un 3% BSA y después las membranas se lavaron con TBS y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Seguidamente al lavado con TBS, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario y las bandas se visualizaron mediante el empleo de un sustrato quimioluminiscente conteniendo luminol (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific, EE.UU). Las bandas obtenidas se fotografiaron con un sistema FlourChem® FC2 imaging system (Alpha Innotech, EE.UU) o se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). La intensidad de las bandas se midió utilizando el programa Image Master Total Lab. Las concentraciones de anticuerpos empleadas fueron las indicadas para cada uno de los diferentes ensayos según se indica en la **Tabla 3**:

Anticuerpo	Dilución de empleo	Proteína	Procedencia
Conejo anti-AOX1/2	1:500	Oxidasa alternativa de plantas. Derivado de un motivo consenso C-terminal altamente conservado de las 2 isoformas 1A y 2, de la AOX de plantas (incluyendo <i>A. thaliana</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Oryza sativa</i> , conjugado con KLH. Predice reactividad cruzada con <i>T. thermophila</i> entre otros.	Agrisera
Conejo anti-Hsp70	1: 500	Chaperonas 70. Generado frente a las secuencias de aminoácidos 342–641 del extremo C-terminal de la Hsp70 de origen humano.	Santa Cruz Biotechnology, (EE.UU)
Ratón anti-epitopo T7-Tag (monoclonal)	1:10000	Generado frente al epitopo del T7-Tag (péptido: MASMTGGGQQMG)	Novagen
Ratón anti-H <sup>+</sup> -PPasa (ADN)	1:50	Generado frente a una secuencia parcial de la H <sup>+</sup> -PPasa de <i>P. dicentrarchi</i> expresado en el vector pTarget.	Producción propia
Ratón anti-H <sup>+</sup> -PPasa recombinante	1:50	Generado frente a una secuencia parcial de la H <sup>+</sup> -PPasa de <i>P. dicentrarchi</i> expresado en PGEM T-Easy, en <i>E. coli</i> .	Producción propia
Ratón anti-H <sup>+</sup> -PPasa recombinante (levaduras)	1:50	Generado frente a una secuencia parcial de la H <sup>+</sup> -PPasa de <i>P. dicentrarchi</i> expresado en el vector YEpFlag-1 en <i>S. cerevisiae</i>	Producción propia
Ratón PAB <sub>HK</sub>	1:100	Generado frente a la isoforma I de la H <sup>+</sup> -PPasa (péptido: HKAAVIGDTIGDPLKDT).	Producción propia
Conejo anti-AVP1	1:2000	Generado frente a la V-PPasa de tipo I de <i>A. thaliana</i>	Agrisera
Cabra anti-Ig conejo	1:6000	Generado frente a inmunoglobulinas de conejo acoplado a HRP	Dakopatts
Conejo anti-Ig de ratón	1:6000	Generado frente a inmunoglobulinas de ratón acoplado a HRP	Dakopatts

**Tabla 3:** Características de los anticuerpos empleados en los Western blot realizados y diluciones a las que se emplearon.

### 5.3.3.- Inmunohistoquímica

#### 5.3.3.1.- Inmunohistoquímica al microscopio óptico

Para este ensayo, se emplearon  $5 \times 10^6$  ciliados que se lavaron con PBS por centrifugación a  $700 \times g$ , 5 minutos, un par de veces, con PBS y se fijaron toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  en una solución de formaldehído al 5 % en PBS. Tras la fijación, los ciliados se lavaron de nuevo dos veces con PBS, se resuspendieron en una solución al 30 % de sacarosa y se embebieron en medio Tissue-Tek® O.C.T™ (Miles Laboratories, EE.UU). Finalmente, y con la ayuda de un criostato, se realizaron secciones de  $12 \mu\text{m}$  de grosor a  $5^\circ\text{C}$  y se dejaron secar los cortes toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  para conseguir una buena fijación al portaobjetos. A continuación, las secciones se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos cada una y en agitación, seguido de un lavado de 10 min con PBS conteniendo 0,2 % Triton X-100 (PBT). El bloque de las uniones inespecíficas y de la peroxidasa endógena se llevó a cabo añadiendo un 3 % de seroalbúmina bovina (BSA) y un 0,5 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBT. Después del bloqueo, las secciones se lavaron otras 3 veces con PBT, 5 min por lavado, y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche en una solución conteniendo un 3 % de BSA, 15 % de suero normal de conejo y una dilución 1:100 del suero problema, ratón anti- $\text{H}^+$ -PPasa recombinante. Luego, las secciones fueron lavadas 3 veces con PBT seguido de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, con una dilución del anticuerpo 1:500 conejo anti-ratón (Dakopatts) preparado en PBT conteniendo un 3 % de suero normal de conejo y un 3 % de BSA. Después de 3 lavados con PBT, la solución de revelado, diaminobencidina, (DAB, SIGMAFAST™ 3, 3'-Diaminobenzidine; Sigma) conteniendo un 0,01 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue añadida, y se dejó actuar durante 10 min. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en una batería de etanoles, metidas en xileno y montadas en Entellan® (Merck Millipore) para su visualización al microscopio óptico.

### 5.3.3.2.- Inmunohistoquímica al microscopio inmunoelectrónico

Los ciliados ( $5 \times 10^6$  células) en fase exponencial de crecimiento fueron centrifugados a  $750 \times g$  durante 5 min, lavados dos veces con tampón Sörensen (tampón Na/K 0,1 M, pH 7,3; TS) y el pellet fue fijado durante 1 h en 4 % paraformaldehído, 0,1 % de glutaraldehído en TS a 4 °C, seguido de dos lavados con TS de 10 min cada uno. Posteriormente se realizó una incubación en glicina 0,02 M en TS durante 10 min con un lavado posterior en TS y deshidratación en serie con alcoholes preenfriados (30, 50, 70, 80, 96 y 100 %; 10 min en cada uno). Tras la deshidratación, el pellet se incluyó en una mezcla 2:1 de etanol 100 % y resina (*LR White uncatalized, Santa Cruz Biotechnology, INC.*) y después en resina/etanol 2:1 (20 min cada uno) para posteriormente embeber la muestra en resina pura, preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurridas 2 h, se volvió a centrifugar para recoger el pellet y embeberlo en resina fresca en la que permaneció toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó un nuevo cambio de resina y se dejó polimerizar a 65 °C en vacío durante 48 h (Philimonencko y col., 2002).

Las secciones, de 80 nm de grosor, fueron cortadas con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Reichert Ultracut E (Leica Microsystems AG, Alemania) y fueron depositadas en rejillas de níquel (300 mesh, 3 mm, Sigma-Aldrich) y sometidas a un proceso de bloqueo con suero normal de cabra (SNC) al 10 % y BSA en PBT (PBT; 1 % BSA, 0,1 % Tween-20 en tampón fosfato salino, pH 7,4) durante 30min a temperatura ambiente. Seguidamente, las secciones, fueron incubadas con los anticuerpos primarios (ratón anti-pirofosfatasa o conejo anti-AVP1 (Agrisera) diluido 1:100 en PBT y conteniendo un 1 % de durante 2 h, a temperatura ambiente. Se realizaron asimismo controles conteniendo solamente SNC. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBT con 0,005 % de Tween-20 y posteriormente se incubaron con los anticuerpos



secundarios (cabra anti-ratón o cabra anti-conejo, marcados con oro (Sigma–Aldrich) durante 1 hora, a una dilución 1:50, a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron 2 veces más con PBT con 0,05 % de Tween-20 y otras dos veces con H<sub>2</sub>O bidestilada y se dejaron secar al aire. Una vez secas, las secciones fueron contrastadas con una solución de acetato de uranilo saturado en agua y citrato de plomo, y observadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-2010 a 120 kV (JEOL, Japón). Se realizaron también controles sin anticuerpo primario.

#### 5.3.4.- Inmunofluorescencia

Para la inmunolocalización de las dos isoformas de la H<sup>+</sup>-PPasa del ciliado, a través del empleo del anticuerpo producido frente al péptido sintético, así como el marcaje del anticuerpo de la H<sup>+</sup>-PPasa recombinante producido en levaduras y la AVP1 de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia del siguiente modo: los ciliados (5 x 10<sup>6</sup>) se lavaron dos veces con tampón fosfato Dulbecco (DPBS, Sigma Aldrich) por centrifugación a 700 x g, 5 min y se fijaron durante 5 minutos con una solución de formaldehído al 4 % en DPBS. Siguiendo a la fijación, los ciliados se lavaron por centrifugación con DPBS y se resuspendieron en una solución con 0,1 % de Triton X-100 durante 3 minutos y después se lavaron dos veces con DPBS. A continuación, se incubaron con 1 % de BSA durante 30 minutos y después del bloqueo se incubaron toda la noche a 4 °C con una solución conteniendo cada uno de los anticuerpos por separado (anti-H<sup>+</sup>-PPasa recombinante de levaduras y PAB<sub>HK</sub>) a una dilución 1:100. Tras 3 lavados con DPBS, los ciliados se incubaron, durante 1 h a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo acoplado a FITC (Sigma –Aldrich), a una dilución 1:100. Después de 3 lavados con DPBS, los ciliados se visualizaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan, Alemania).

Tras la inmunofluorescencia, algunos ciliados se tiñeron doblemente para visualizar los núcleos. Para ello, los ciliados se incubaron con una solución 0,8 mg/ml de 40, 6-diamidine-20-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) en DPBS durante 15 min a temperatura ambiente. Después de varios lavados con DPBS, se montaron en DPBS/glicerol 1:1 se visualizaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan, Alemania) y/o al microscopio confocal (Leica TCS-SP2, LEICA Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania).

## **6.- Técnicas Fisiológicas y Bioquímicas**

### **6.1.- Técnicas para el estudio de la función mitocondrial**

#### *6.1.1.- Determinación del consumo de oxígeno mitocondrial*

Para estudiar el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, se realizó un ensayo polarográfico mediante la medición del consumo de O<sub>2</sub> con un electrodo de Clark. Para ello, los ciliados fueron permeabilizados con digitonina (DIG) (Sigma –Aldrich) (Cuperus y col., 2010). La suspensión de ciliados (3 x 10<sup>6</sup> ciliados /ml) se lavó dos veces con medio L-15 incompleto, (medio L-15 sin nucleósidos, glucosa, lípidos ni FBS) por centrifugación a 700 x g, 5 min. A continuación, se añadió el inhibidor de proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF; Sigma-Aldrich) a una concentración final 1 mM y DIG a una concentración final de 6,6 µM. Los tubos se agitaron cuidadosamente durante un minuto para evitar romper los ciliados, y se volvieron a centrifugar a 700 x g 5 min a 4 °C y se resuspendieron finalmente en medio L-15 incompleto a una concentración de 5 x 10<sup>6</sup> ciliados/mL. Antes de la realización del ensayo, se procedió al calibrado del oxímetro (Hansatech Instruments, UK) y posteriormente se rellenó la cámara de incubación, con 500 µL de medio L-15 incompleto. Tras un breve periodo de estabilización del equipo se añadieron, con el empleo de una jeringuilla Hamilton, para

evitar la formación de burbujas e introducción de aire en la cámara, 50  $\mu$ L de las siguientes soluciones stock preparadas en tampón fosfato salino (PBS): ADP 50 mM, glutamato 1 M (G), succinato 1 M (S) junto con 0,1 mL de células permeabilizadas atemperadas a 25 °C (Morais y col., 2009). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y el consumo de oxígeno fue analizado con el programa informático Oxygraph Plus (Hansatech, UK).

Se estudió el funcionamiento de la cadena respiratoria mediante el consumo de oxígeno con diferentes inhibidores: el cianuro (KCN), un inhibidor de la vía clásica, y el ácido salicilhidroxámico (SHAM), un inhibidor de la vía alternativa de la respiración. Las concentraciones finales de los inhibidores empleadas fueron 100  $\mu$ M KCN y 1 mM SHAM (Sigma-Aldrich). La diferencia en el ratio de consumo de O<sub>2</sub>, antes y después de la adición del compuesto, fue determinada como porcentaje de inhibición.

Para analizar el consumo total de O<sub>2</sub> por los ciliados se ha empleado el mismo método descrito aquí, pero sin tratar los ciliados previamente con DIG y sin adicionarles sustratos metabólicos.

Para el estudio del consumo de oxígeno con el empleo de diferentes inhibidores, las concentraciones finales de los inhibidores antimicina A (AMA), *trans*-resveratrol (RESV) y propilgalato (PG) fueron de 100  $\mu$ M. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y el consumo de oxígeno fue analizado con el software Oxygraph Plus (Hansatech UK).

#### 6.1.2.- Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

El  $\Delta\Psi_m$  de *P. dicentrarchi* se determinó empleando el kit JC-1 (Invitrogen, EE.UU), con la sonda catiónica fluorescente yoduro de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3' tetraetil- benzimidazol-carbocianina (JC-1).

La sonda JC-1 es un colorante catiónico que se acumula en las mitocondrias en función del potencial de membrana, pasando de fluorescencia verde a roja y dando lugar a la formación de agregados rojos al incrementarse

el potencial. La despolarización de la membrana implica, por lo tanto, una disminución de la relación de la intensidad de fluorescencia roja/verde (Roy y col., 2008).

Para este ensayo,  $5 \times 10^5$  trofozoítos de *P. dicentrarchi*/mL se resuspendieron en medio L-15 conteniendo PG a unas concentraciones finales de 0, 6,25, 12,5 y 25  $\mu\text{M}$ , RESV a unas concentraciones finales de 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  y se incubaron en una placa multipocillos de 96 pocillos durante 2 horas a 25 °C (Morais y col., 2009). Transcurrido este periodo, se añadió en cada pocillo 10  $\mu\text{L}$  de la sonda diluida a 1:10 en medio L-15 se incubó en oscuridad durante 30 min a 25 °C. Seguidamente el PG y el RESV se eliminaron por centrifugación de las placas a 200 x g durante 5 min y los trofozoítos se lavaron dos veces con 200  $\mu\text{L}$  de medio L-15 y se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de L-15. Finalmente, la fluorescencia emitida se midió en un fluorímetro de microplacas (FLx800, Biotek, EE.UU), con unos filtros de excitación/emisión de 485/535 nm. En todos los experimentos, la fluorescencia producida por la oxidación espontánea de la sonda fue sustraída de los valores de fluorescencia obtenida de las muestras experimentales.

## 6.2.- Actividad translocadora de $\text{H}^+$ dependiente de pirofosfato

El ensayo se llevó a cabo por fluorimetría usando naranja de acridina como indicador de la diferencia de pH transmembrana en medio de ensayo enriquecido en vacuolas del ciliado. El naranja de acridina es un colorante catiónico fluorescente que se acumula en los compartimientos ácidos, ya que su forma no ionizada prevalece en punto muerto para ambientes alcalinos, emitiendo fluorescencia verde, en este estado difunde fácilmente a través de las membranas; sin embargo, su forma ionizada, que prevalece en ambientes ácidos y emite fluorescencia naranja, no atraviesa la membrana. Consecuentemente, la acumulación de naranja de acridina en compartimientos

ácidos, puede ser visualizada como un naranja brillante observando al microscopio de epifluorescencia. La pérdida de la compartimentalización de la fluorescencia naranja o el incremento de la fluorescencia verde en el citosol, es un signo de alcalinización (Rohloff y Docampo., 2006).

Los ciliados ( $2,5 \times 10^5$  células) fueron lavados con PBS por centrifugación. Se resuspendieron en el tampón de ensayo conteniendo 100 mM KCl, 0,4M glicerol, 1mM Tris-EGTA, and 5 mM Tris-HCL, 1 mM PMSF y 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, pH 8. El pellet de células fue homogeneizado en un Homogeneizador PotterS (Braun Biotech, EE.UU) hasta que la lisis fue mayor del 90 % (generalmente 30 segundos). La mezcla fue resuspendida en 5 mL de tampón de ensayo, centrifugado a  $750 \times g$  durante 5 min (para eliminar las células que no estén rotas). El sobrenadante obtenido fue centrifugado a  $15000 \times g$  durante 10 min, y el pellet fue resuspendido en 1 mL de tampón de ensayo conteniendo una concentración de naranja de acridina de  $2.5 \mu\text{M}$ . La reacción fue iniciada por la adición de Tris-PPi (1 mM) al medio, en el que ya hay una concentración de  $\text{MgSO}_4$  de 1,3 mM. La cinética del decrecimiento de la fluorescencia fue medida a 485/530 excitación/emisión en un fluorímetro (*Fluox800*, BioTek, EE.UU.) (Zhen y col., 1997, Hill y col., 2000; Marchesini y col., 2000; Rodrigues y col., 2000). En todas las ocasiones se estableció un control negativo del ensayo sin adición de pirofosfato. El primer ensayo de translocación se llevó a cabo de este modo, empleando una fracción de los ciliados, enriquecida en vesículas, para comprobar que efectivamente, los resultados obtenidos eran correspondientes a esos orgánulos, pero para el resto de ensayos de translocación, se emplearon ciliados permeabilizados con DIG a una concentración final de  $6,6 \mu\text{M}$ , en lugar de la fracción enriquecida en vacuolas.

Previamente al ensayo de translocación, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- $\text{H}^+$ -PPasa vacuolar del ciliado para verificar que la fracción que se va a emplear en el ensayo como muestra

efectivamente está enriquecida en vacuolas del ciliado. La fracción obtenida se incubó durante 30 min en tampón de bloqueo conteniendo un 1 % de BSA en PBS a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-H<sup>+</sup>-PPasa a una dilución 1:100 y conteniendo un 1 % de BSA y 0,05 % de Triton X- 100 en PBS y después se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBS. Finalmente, se añadió el anticuerpo secundario anti-Ig de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:80 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de realizar 3 lavados con PBS, las muestras se montaron en una solución de PBS/glicerol 1:1 y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan, Alemania).

En el caso de *P.berghei*, la muestra se preparó centrifugando la sangre obtenida conteniendo 0,1 mg/mL de heparina, a 2500 x g durante 5 minutos y sobre el pellet se añadió agua y PMSF. Posteriormente, se añadió el volumen necesario de DPBS (10X) para que quedase a una concentración final de 1X, se centrifugó a 3000 x g y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en tampón de ensayo con naranja de acridina y se realizó el ensayo, en este caso a 37 °C.

Los compuestos empleados para ver las variaciones en la actividad se añadieron desde soluciones stock en tampón de reacción (Moreno y col., 2011) y fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich. El NH<sub>4</sub>Cl se añadió como control final del ensayo, ya que actúa como alcalinizador, y por lo tanto se confirma que el decrecimiento en la fluorescencia con el naranja de acridina está atribuido a su acumulación en un compartimento ácido (Rodrigues y col., 1999 a y b; Lemercier y col., 2002).

### **6.3.- Técnicas de análisis del pH intracelular: tinciones fluorescentes con colorantes sensibles al pH.**

Los ciliados ( $5 \times 10^5$  células) se centrifugaron a  $700 \times g$  durante 5 min y se lavaron 2 veces con PBS seguido de una tinción durante 10 min con una solución de naranja de acridina  $3 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich) y/o con una solución Lysotracker Red DND-99 (Life Technologies) a una concentración de  $75 \text{ nM}$ . Después de la tinción, los ciliados fueron observados en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación BP 546 nm, de espejo dicróico y un filtro de emisión FT 580 nm, LP 590 nm (para el naranja de acridina), y un filtro BP 450-490 nm, FT 510 nm y LP 520 (para el caso del Lysotracker Red DND-99).

### **6.4.- Determinación del calcio intracelular**

Los ciliados se lavaron 2 veces por centrifugación y se resuspendieron en medio de ensayo (1X HBSS, 20 mM HEPES) a una concentración de  $1,25 \times 10^6$  ciliados/mL. Posteriormente, se incubaron con los diferentes tratamientos durante 1 hora en una microplaca de 96 pocillos a  $21^\circ\text{C}$ . Después de la incubación, se añadió la sonda marcadora de calcio, Fluo-4 AM (Life Technologies), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante y se midió la fluorescencia (Ex: 494 nm, Em: 516 nm) en un fluorímetro (*Flx800*, BioTek, EE.UU). Se emplearon controles negativos con ciliados sin sonda de calcio Fluo-4 AM (Takahasi y col., 1999; Paredes y col., 2008). Para el ensayo de localización de calcio, los ciliados se incubaron simplemente con la sonda y se visualizaron posteriormente con el microscopio de fluorescencia.



### 6.5.- Determinación de los niveles de PPi

El ensayo para la determinación de PPi fue llevado a cabo en lisados de ciliados cultivados durante 3 días con diferentes tratamientos. Se centrifugaron  $2 \times 10^6$  ciliados/mL a  $700 \times g$  durante 5 min, y el pellet se lavó un par de veces con PBS por centrifugación a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 1 mL de agua destilada fría conteniendo PMSF a una concentración de 1 mM y se incubó en hielo durante 15 min. Tras la incubación, se rompieron las células por sonicación (10 ciclos de 5 pulsos en un W-250 sonicador (Branson Ultrasonic Corporation), y seguidamente, se centrifugaron a  $10000 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$  para eliminar los restos celulares. La concentración proteica de los lisados fue determinada por el método de Bradford empleando una concentración conocida de BSA, como estándar. A esta solución proteica se le añadieron 10  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra concentrado 10X ( $\text{MgCl}_2$  30 mM, EDTA 2 mM, BSA 2 %) y se filtró a través de un filtro de 10 kDa de tamaño de poro, Amicon Ultra-0,5 mL (Merck-Millipore, USA) para eliminar el PPi endógeno.

La determinación de PPi se realizó espectrofotométricamente a través del empleo del reactivo comercial, “PPi reagent” (P7275, Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante mediante la medición del descenso de la absorbancia a 340 nm, durante 10 min. Esta técnica se basa en la oxidación de dos moles de NADH a NAD, por mol de PPi consumido, por la actividad de la fructosa 6-fosfato quinasa dependiente de PPi (PFK-PPi). Se empleó una concentración de 22 mg por muestra y el volumen final de reacción empleado fue de 100  $\mu\text{L}$ . Se empleó como estándar PPi a una concentración de 1 mM (O'Brien, 1976).

## 7.- Análisis filogenéticos, bioinformáticos y estadísticos

### 7.1.- Análisis filogenéticos

Para estudiar la variación del gen de la  $H^+$ -PPasa en diferentes cepas del ciliado *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1), una vez extraídas las muestras de ADN de la forma descrita con anterioridad, se realizó la PCR con los cebadores de una secuencia parcial de la  $H^+$ -PPasa de *P.dicentrarchi* del mismo modo explicado previamente. (F/R PiPh (directo/reverso: 5'-ATTGATGTCAACGCCCCCTT-3'/5'-CGGGACCAGAGGTATCTTTTA-3'). Una vez realizada la PCR con una enzima de alta fidelidad (NZYProof DNA polymerase NZYTech), los productos de PCR se purificaron con GeneJet PCR Purification Kit (Life-Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se clonaron en el vector pJET1.2/blunt, con el kit comercial (CloneJET PCR Cloning Kit, Life-Technologies) y se enviaron al servicio de secuenciación (Sistemas Genómicos, España) (**fig. 19**). Las secuencias de aminoácidos, fueron obtenidas de la secuencia nucleotídica del gen de la  $H^+$ -PPasa mediante la herramienta de traducción del portal de recursos bioinformáticos Expasy empleando el código genético de ciliados, y estas fueron alineadas con los programas de alineamiento múltiple Clustal W2 y Clustal Omega (Sievers y col., 2011) y editadas con Jalview Multiple Alignment Editor V1.8. Los sitios conteniendo huecos (*gaps*) fueron excluidos. Las distancias genéticas fueron calculadas para cuantificar la divergencia de secuencia entre los aislados empleando el modelo de dos parámetros de Kimura (1980), tal y como está implementado en la versión 6.0 del programa MEGA (Tamura y col., 2013). Los árboles filogenéticos fueron contruidos con el programa MEGA mediante la aplicación del método de *neighbour-joining* (NJ), aplicando el modelo corrector de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980) mediante la

realización de 1000 réplicas de *bootstrap* (Saitou y col., 1987), como se ha descrito anteriormente.

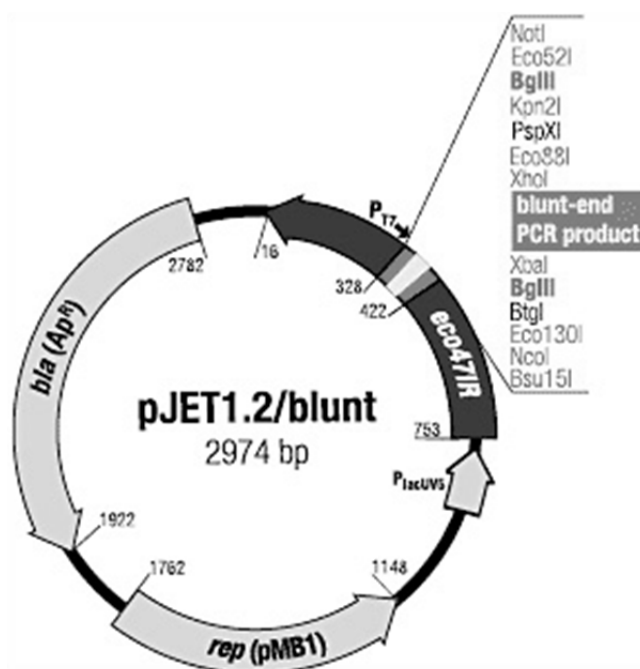


Figura 19: Mapa del vector de expresión pJET 1.2/blunt

## 7.2.- Análisis Bioinformático

La identificación de dominios proteicos y el análisis funcional de las proteínas, fueron realizados utilizando la herramienta InterProScan (versión 4.8) del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), disponible en la siguiente página web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/> (Zdobnov y Apweiler, 2001; Quevillon y col., 2005). El modelado de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi* ha sido realizado empleando servidor Swiss-model accesible a través de la página del ExPASy o en el Deep View (Swiss PDB-Viewer) en <http://swissmodel.expasy.org/> (Kiefer y col., 2009). Para determinar las propiedades fisicoquímicas de las H<sup>+</sup>-PPasas desde la secuencia de aminoácidos, se empleó la herramienta bioinformática ProtParam del servicio ExPASy disponible en la siguiente dirección: <http://web.expasy.org/tools/protparam/>. Con la intención de predecir las

señales de exportación nuclear ricas en leucina (NES) en la secuencia de la proteína se empleó el servidor NetNES 1.1 disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>. La predicción de los sitios de fosforilación de la proteína fue realizada usando el servidor NetPhos Server 2.0 disponible en la siguiente dirección: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>. Para predecir la presencia y localización de los sitios de marcaje del péptido señal en la secuencia de aminoácidos, se empleó el servidor Signal-3L, disponible en: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/> (Shen y Chou, 2007). El servidor NetNglyc se utilizó para pronosticar los sitios de N-glicosilación (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). El pronóstico del lugar en donde la secuencia de aminoácidos de la PPasa contendría dominios de péptido de marcaje mitocondrial, (mTP) se empleó la herramienta bioinformática iPSORT disponible en la siguiente dirección: <http://ipsort.hgc.jp/>. Finalmente, la predicción de los dominios de hélice transmembrana en la proteína, se empleó el servidor THHMM v 2.0 disponible en la página web <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>.

### 7.3.- Análisis estadístico

Los resultados mostrados en las figuras están expresados como medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias significativas ( $p = 0,05$ ) fueron determinadas por análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples Tukey-Kramer.

# *Resultados*

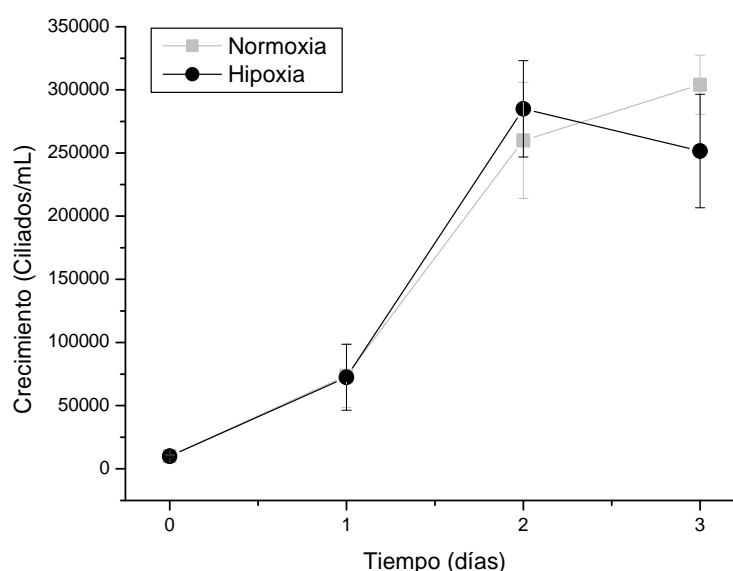
---



## 1. - Estudio de la existencia de una oxidasa alternativa (AOX) en la respiración mitocondrial de *P. dicentrarchi* y su modulación

### 1.1- Crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi* bajo condiciones de normoxia e hipoxia.

Para evaluar el crecimiento de *P. dicentrarchi* en condiciones microaerófilas, los ciliados se incubaron durante 3 días con diferentes concentraciones de oxígeno en medio L-15 suplementado con 10% FBS a 21°C, partiendo de un inóculo inicial de  $10^4$  ciliados/mL. Los ciliados se cultivaron bajo condiciones de normoxia, empleando frascos de cultivo con tapas que permitiesen la ventilación y en hipoxia, con tapas selladas y en frascos con medio previamente burbujeadado con argón para desplazar los gases disueltos, incluido el oxígeno. Los resultados se muestran en la **figura 20**, en la que puede observarse que la cinética de crecimiento es muy similar en ambas condiciones, no existiendo diferencias significativas entre el crecimiento *in vitro* de ambos cultivos.

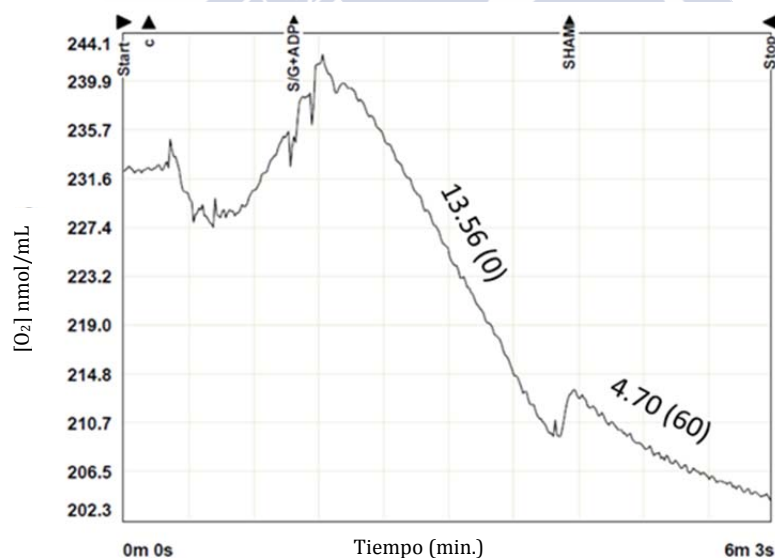


**Figura 20:** Efecto de la presencia de oxígeno sobre el crecimiento del ciliado. Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar correspondiente a 5 ensayos ( $n=5$ ).

## 1.2.- Presencia de una ruta alternativa en la respiración mitocondrial de *P. dicentrarchi*.

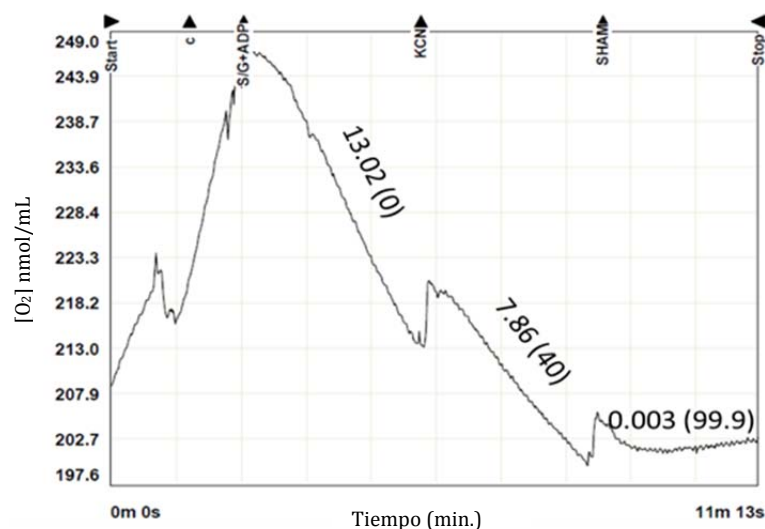
Para determinar la existencia de una posible ruta de transporte de electrones alternativa en *P. dicentrarchi*, se llevó a cabo un estudio de actividad respiratoria mitocondrial, mediante un ensayo polarográfico de consumo de  $O_2$ . Éste se realizó en ciliados en fase estacionaria (cultivos de 7 días) permeabilizados con digitonina. Inicialmente, se testó el efecto del SHAM, un inhibidor específico de la ruta alternativa de la respiración, sobre el consumo de  $O_2$ . El SHAM, a 1 mM, produjo un descenso en el consumo de  $O_2$  de un 60%, con respecto a los ciliados en ausencia de inhibidor. Posteriormente, se determinó el efecto conjunto del SHAM con el KCN (inhibidores de la vía alternativa y de la vía clásica, respectivamente). Al añadirle KCN (100  $\mu$ M), se produjo una inhibición del 40% en el consumo de  $O_2$ , y la respiración quedó totalmente bloqueada al añadirle posteriormente SHAM (fig. 21).

A)





B)



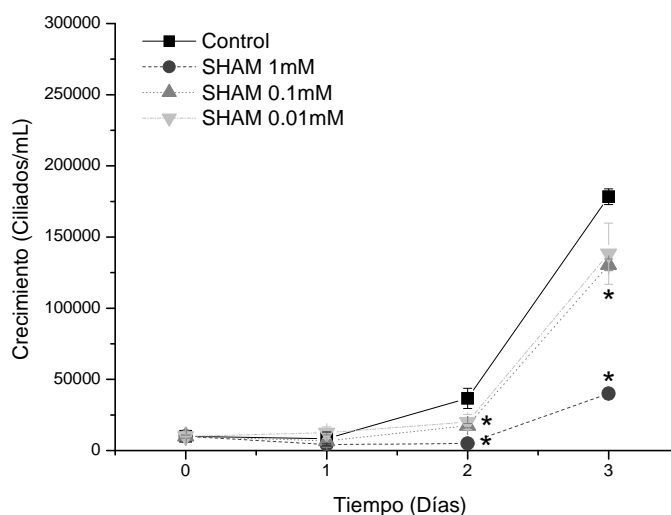
**Figura 21:** Ensayos polarográficos con electrodo de Clark representando el consumo de  $O_2$  llevado a cabo por trofozoitos de *P. dicentrarchi* (c) permeabilizados con digitonina. Se emplearon  $2.5 \times 10^5$  ciliados por ensayo, a los que se les añadieron como inductores de la respiración ADP, succinato (S) y glutamato (G) y como inhibidores: **A)** ácido salicilhidroxámico (SHAM) 1 mM y **B)** cianuro (KCN) 100  $\mu$ M y SHAM 1 mM. Las curvas muestran el valor medio de consumo de  $O_2$  de 5 experimentos independientes, para cada inhibidor y los números se corresponden con los valores medios de consumo en cada tramo (antes y después de la adición de los inhibidores) y los porcentajes de inhibición medios. El consumo fue calculado en nmol/mL.

### 1.3.- Efecto antiparasitario del SHAM en condiciones de normoxia e hipoxia

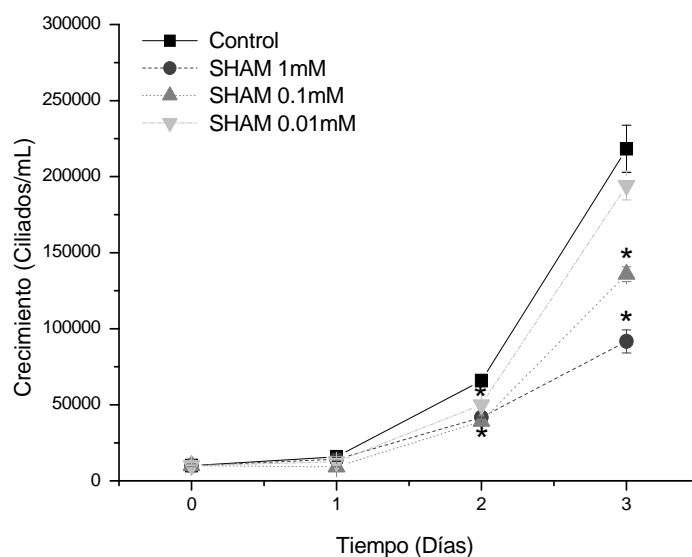
Se ha evaluado si el SHAM afecta al crecimiento y viabilidad del parásito cultivado en medio con diferentes concentraciones de oxígeno. Para ello, los ciliados incubaron durante tres días en medio L-15 suplementado con un 10% de FBS al que se le añadieron diferentes concentraciones de SHAM (0,01, 0,1 y 1 mM), en condiciones de normoxia e hipoxia, obtenidas como se han descrito anteriormente. El cultivo de partida fue de  $10^4$  ciliados/mL y se estableció un control al que se le añadió solamente DMSO a la máxima concentración que se empleó en el ensayo. Se ha comprobado que el DMSO empleado para solubilizar el SHAM no afecta al consumo de  $O_2$  a las máximas concentraciones usadas. Se observó que el SHAM inhibe el crecimiento de *P. dicentrarchi* de forma dosis dependiente, observándose diferencias

significativas entre los grupos control y tratados a partir del día 2. Esta inhibición se produce de forma más efectiva en condiciones de normoxia con respecto a condiciones de hipoxia como puede observarse con los valores obtenidos según el cálculo de la dosis letal 50 ( $IC_{50}$ ) (**fig. 22**).

**A)**



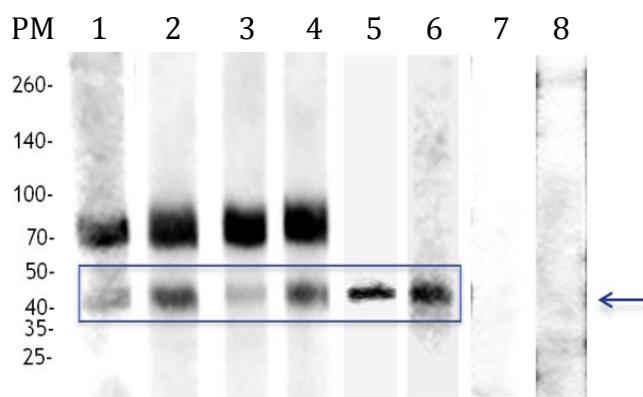
**B)**



**Figura 22:** Curvas de crecimiento a partir de los cultivos *in vitro* de ciliados de la especie *P. dicentrarchi* durante 3 días en condiciones de **A)** normoxia  $IC_{50}$ : 0,5 mM a día 3 y **B)** hipoxia ( $IC_{50}$ : 0,7 mM) y con concentraciones de SHAM de 0,01, 0,1 y 1 mM. Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de 5 ensayos. Los asteriscos representan las diferencias significativas relativas a cada uno de los controles con  $P < 0,01$  ( $n=5$ ).

#### 1.4.- Identificación de una AOX insensible al cianuro en *P. dicentrarchi*

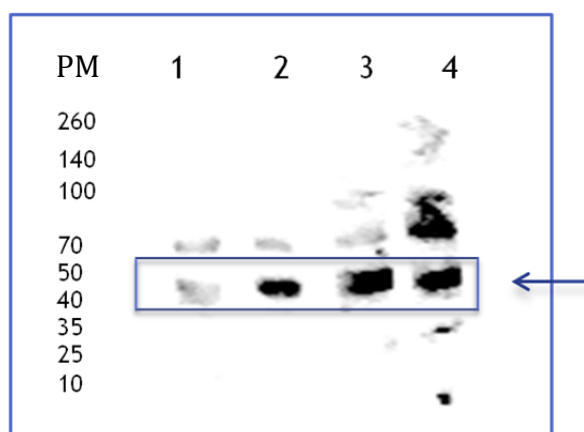
La identificación y caracterización de la AOX de *P. dicentrarchi* se llevó a cabo por Western blot, usando un anticuerpo policlonal de ratón producido tras la inmunización con un péptido sintético derivado de un motivo consenso C-terminal altamente conservado en las 2 isoformas de la AOX de plantas, conjugado con KLH (Keyhole limpet hemocyanin). En el inmunoblot de las proteínas totales del ciliado en condiciones reductoras, incubadas con el anticuerpo anti-AOX, puede observarse que éste muestra una importante reactividad con la oxidasa del ciliado (**fig. 23**). En los inmunoblots de proteínas totales, se observan 2 bandas de pesos moleculares de 70 y 42 kDa, respectivamente (**fig. 23, líneas 1- 4**). La banda de 42 kDa es más intensa en los extractos de ciliados cultivados bajo condiciones de hipoxia que en los cultivados en normoxia (**fig. 23, líneas 2 y 4**). Sin embargo, la banda de 70 kDa tiene una intensidad similar en todos ellos. Por lo tanto, cuando se analizan los patrones de reconocimiento anti-AOX en extractos de proteínas totales de cultivos en normoxia o hipoxia, o de ciliados obtenidos por infecciones experimentales, solamente se observa variación en el patrón de la banda de 42 kDa. En los inmunoblots realizados con proteínas asociadas a membrana, solamente aparece la banda de 42 kDa y el patrón de expresión de ésta no se ve afectado por el tratamiento reductor con DTT (**fig. 23, líneas 5 y 6**).



**Figura 23:** Análisis mediante Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-AOX, de extractos totales y membranales (MAP) de *P. dicentrarchi*, obtenidos a partir de cultivos en normoxia (tiras 1 y 3), cultivos en hipoxia (tira 2), de ciliados obtenidos de infecciones experimentales (tira 4), y de proteínas de membrana de ciliados crecidos en hipoxia y bajo condiciones reductoras (con DTT, tira 5) y no reductoras (sin DTT, tira 6). De cada uno de los extractos se emplearon 30 µg proteína/tira. Las tiras 7 y 8 muestran la señal obtenida usando un suero policlonal normal de conejo frente a un extracto proteico total y uno de proteínas asociadas a membrana, respectivamente. PM: marcador de peso molecular de proteínas, mostrando los valores en kDa. La flecha y el recuadro indican la banda que posee una expresión variable entre los diferentes tratamientos.

### **1.5.- Efecto de los inhibidores de cadena de respiración mitocondrial en la expresión de la AOX en *P. dicentrarchi***

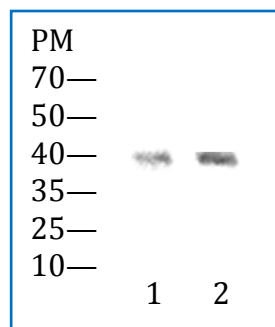
Para analizar la regulación de la expresión de la oxidasa alternativa en *P. dicentrarchi* se han realizado diferentes tratamientos con los inhibidores estándar de los componentes de la cadena respiratoria. Los inhibidores de la vía clásica que se testaron fueron el KCN y la antimicina A (AMA) ambos a una concentración de 100 µM, y como inhibidor de la ruta alternativa se empleó el SHAM a una concentración de 1mM. Estos inhibidores se utilizaron en ciliados procedentes de cultivos normóxicos y en la fase logarítmica de crecimiento y se dejaron actuar durante un periodo de 4 horas. Posteriormente, se realizó un Western blot con un extracto de las proteínas totales del ciliado (**fig. 24**). En todos los casos, la incubación de los ciliados con los inhibidores se tradujo en un incremento de la expresión de la AOX, en comparación con el cultivo control sin inhibidores.



**Figura 24:** Análisis mediante Western blot con un anticuerpo policlonal anti-AOX de un extracto proteico total de *P. dicentrarchi* bajo condiciones reductoras (con DTT), obtenido a partir de cultivos crecidos en condiciones de normoxia (tira 1) e incubados en presencia de KCN (tira 2), AMA (tira 3) y SHAM (tira 4). De cada uno de los extractos se emplearon 30  $\mu$ g/carril. PM: Marcador de peso molecular de proteínas en kDa. La flecha y el recuadro indican la banda correspondiente a la expresión de la AOX.

### 1.6.- Consumo de O<sub>2</sub> y expresión de la AOX en ciliados procedentes de una infección experimental en rodaballo

Para estudiar las variaciones entre ciliados mantenidos durante varios años en cultivo *in vitro* en laboratorio y ciliados recién extraídos de líquido ascítico de rodaballo, y comprobar el consumo de O<sub>2</sub> de un modo más parecido a lo que se produciría durante la fase parásita, se realizó una infección experimental y se utilizó esta muestra para medir el consumo de O<sub>2</sub> a través del empleo de un ensayo polarográfico con electrodo de Clark, así como la variación en la expresión del gen de la AOX mediante Western blot, empleando proteínas de membrana del ciliado y un anticuerpo policlonal anti-AOX. Como puede observarse en la **figura 25**, los ciliados recién salidos del pez, en el que se encontrarán en condiciones de anoxia, muestran una mayor expresión de la proteína. El consumo de oxígeno obtenido fue menor (pendiente de -1,84/min) en los ciliados extraídos del pez con respecto a los de cultivo en laboratorio (-4,99/min).

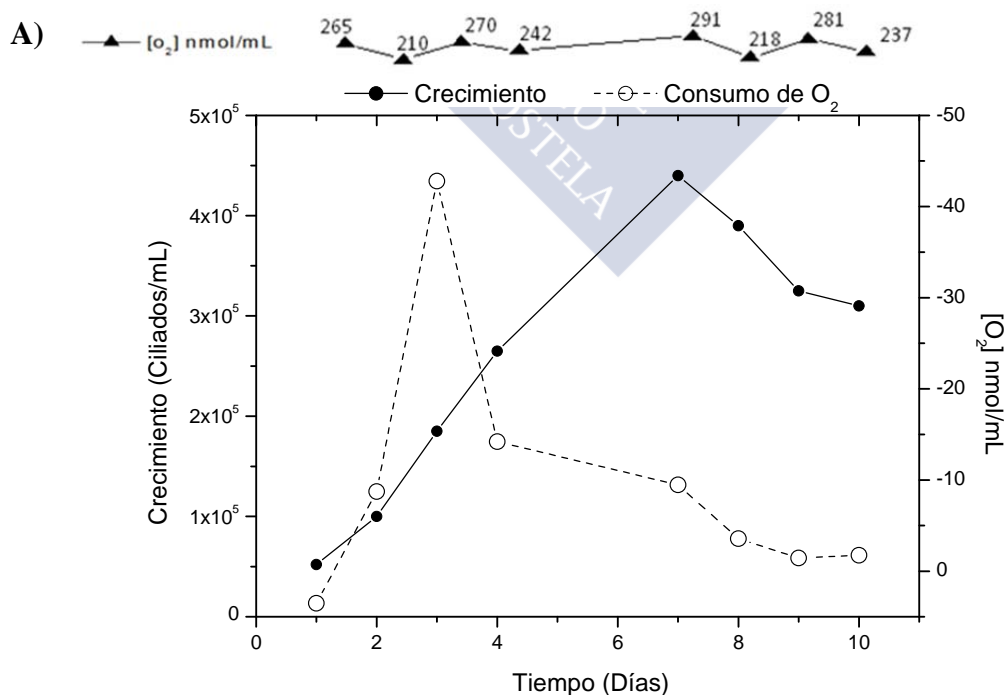


**Figura 25:** Western blot con una fracción de proteínas membranales (MAP) del ciliado en condiciones reductoras. **1:** muestra de ciliados de cultivo *in vitro*. **2:** muestra de ciliados recién extraídos del pez. PM: Marcador de peso molecular de proteínas en kDa.

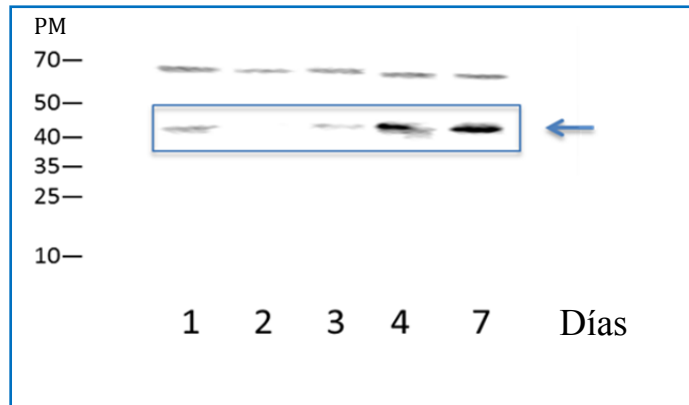
### 1.7.- Consumo de oxígeno y niveles de AOX durante el cultivo *in vitro* de *P. dicentrarchi*

Se analizaron simultáneamente el consumo de oxígeno y la presencia de la enzima en ciliados durante las diferentes fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) bajo condiciones de normoxia. Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron con un ensayo polarográfico y las variaciones en los niveles de la enzima mediante el empleo de Western blot con extractos proteicos totales frente a un anticuerpo policlonal anti-AOX. Simultáneamente, se evaluó el consumo de  $O_2$  en ciliados, en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, permeabilizados con digitonina e incubados con inhibidores de la vía clásica (AMA) y alternativa (SHAM) (**fig. 26**). Durante la fase exponencial de crecimiento, aparece un fuerte incremento en el consumo de oxígeno, con un pico en el día 3 de cultivo, que decrece bruscamente cuando el ciliado entra en la fase estacionaria de crecimiento (a partir del día 4), fase a partir de la cual, los niveles de consumo de oxígeno se mantendrán relativamente bajos. Además, el decrecimiento en el consumo de  $O_2$  por los ciliados parece ser independiente de la concentración de  $O_2$  presente en el medio de cultivo, ya que éste no sufre apenas variaciones en todo el periodo de duración del ensayo (entre 210 y 290 nmol/mL) (**fig. 26 A**). Analizando los niveles de AOX en cultivo, se muestra que éstos son muy

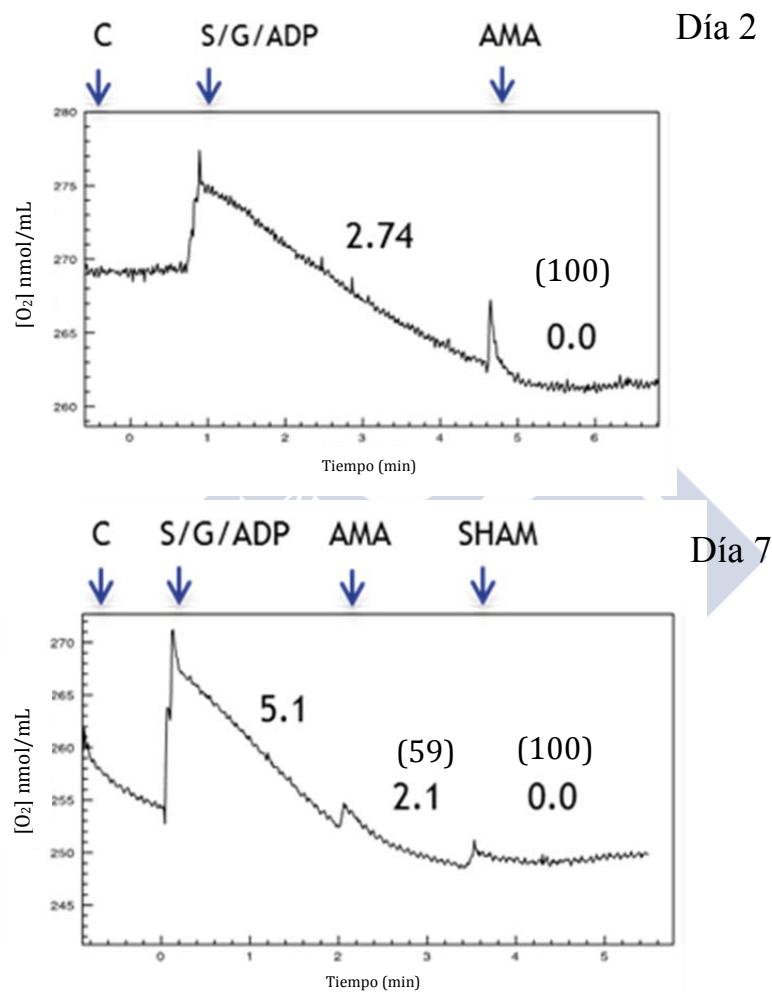
bajos o casi inexistentes durante la fase exponencial de crecimiento (**fig. 26 B, días 2 y 3**). Esta fase coincide con la de incremento de consumo de  $O_2$  por el ciliado (**fig. 26 A**). En contraste, los niveles de AOX se incrementan notablemente durante la fase estacionaria de crecimiento, que coincide con una caída en el consumo de  $O_2$  por los ciliados (**fig. 26 B, días 4-7**). Estos resultados indican que el ciliado estaría usando la vía clásica durante la fase exponencial y la alternativa solamente en la fase estacionaria, concordando con los resultados de expresión de la proteína observados en el Western blot (**fig. 26 B**). El tipo de ruta metabólica que emplean los ciliados según su fase de cultivo puede observarse en la figura 6 C. El consumo de  $O_2$  en ciliados a día 2 de cultivo se realiza principalmente a través de la ruta clásica de la respiración mitocondrial, ya que la incubación con AMA inhibe totalmente la respiración (**fig. 26 C, día 2**); sin embargo, la AMA solo afecta parcialmente a la inhibición en el consumo de  $O_2$  en el día 7 de cultivo (un 59%), en el que los ciliados ya se encuentran en fase estacionaria, indicando que el parásito emplea la ruta alternativa durante esta fase (**fig. 26 C, día 7**).



B)



C)



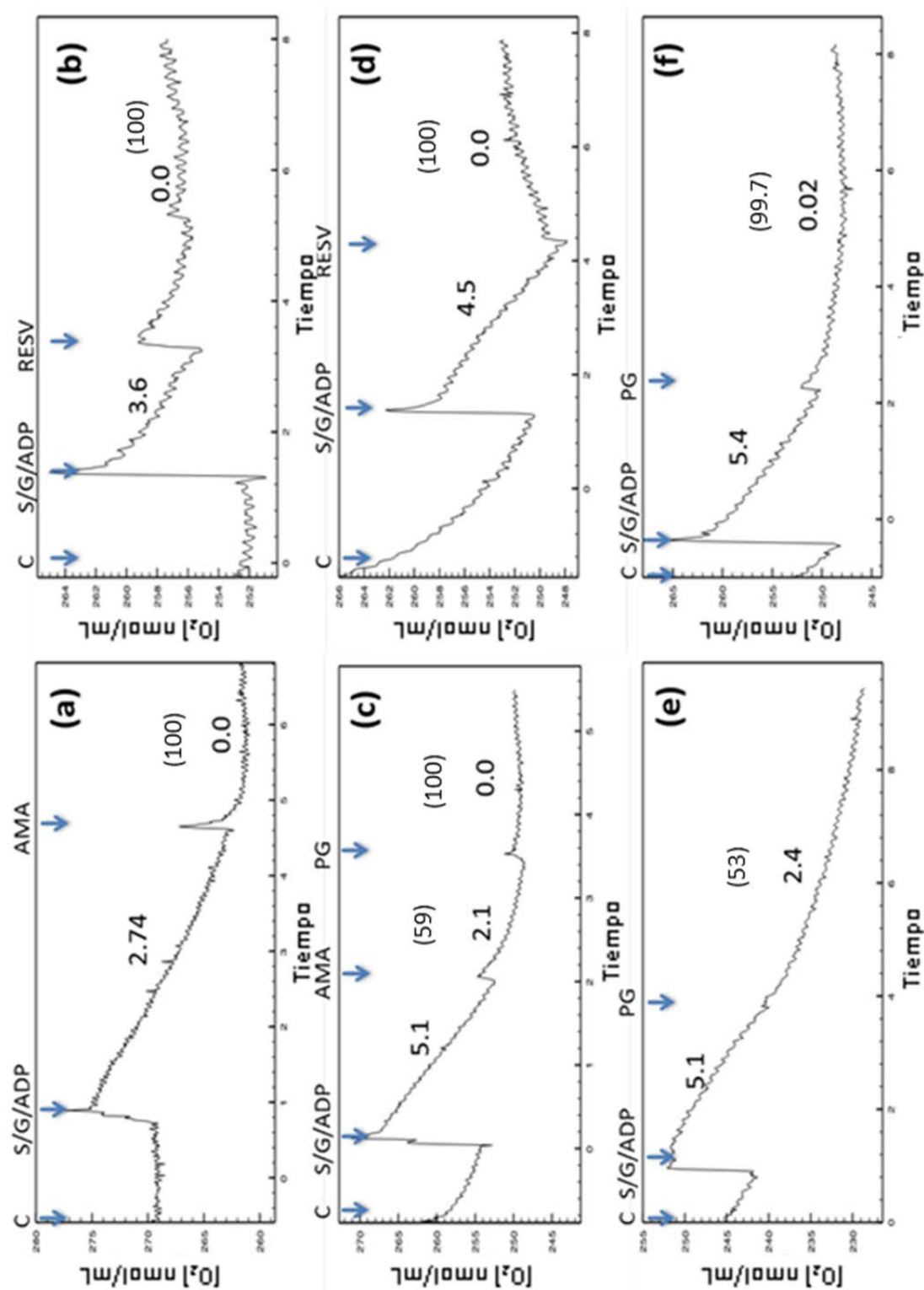
**Figure 26:** Efecto de la cinética de crecimiento en el consumo total de  $O_2$  por trofozoitos de *P. dicentrarchi* en condiciones de normoxia (A) y en ciliados permeabilizados con DIG obtenidos de cultivos en los días 2 y 7 de crecimiento, en los cuales la respiración fue inducida por la adición de succinato (S), glutamato (G) y ADP y después de la inhibición con AMA y SHAM (C), determinado mediante ensayo polarográfico con electrodo de Clark. Los niveles de AOX se determinaron por Western blot en condiciones reductoras en extractos proteicos totales obtenidos de ciliados cultivados del día 1 al 7. (B). PM: Marcador de peso molecular de proteínas en kDa. En la figura A), la curva superior muestra los cambios en la concentración de  $O_2$  (en nmol/mL) en el medio de cultivo durante la duración del experimento.



## 2.- Inhibidores de la oxidasa alternativa como agentes anti-parasitarios frente a la escuticociliatosis

### 2.1.- Efecto de los antioxidantes propilgalato y resveratrol en la respiración del ciliado

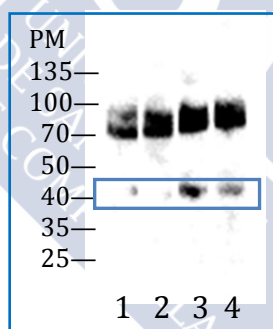
Para estudiar el efecto del propilgalato (PG) y el resveratrol (RESV) sobre la ruta clásica y alternativa, se han realizado ensayos polarográficos de consumo de  $O_2$  con electrodo de Clark en ciliados creciendo en fase exponencial (día 2) en diferentes condiciones fisiológicas: normoxia e hipoxia y permeabilizados con DIG. Ambos se emplearon a una concentración de 100  $\mu M$ . En normoxia, la AMA, también empleada a 100  $\mu M$ , bloquea totalmente la respiración en ciliados a los que se le había inducido la respiración con succinato (S), glutamato (G) y ADP, lo que es indicativo de que, en esas condiciones, el ciliado está respirando solamente a través de la vía clásica, al tratarse la AMA de un inhibidor del complejo 3 de esta vía (**fig. 27 a**). Sin embargo, en hipoxia, la antimicina no inhibe completamente la respiración, pero se inhibe completamente con la adición posterior de PG, indicando que en *P. dicentrarchi* también actúa como un inhibidor de la AOX (**fig. 27 c**). El propilgalato sólo inhibe la respiración parcialmente en normoxia (**fig. 27 e**), pero casi la inhibe en su totalidad en condiciones de hipoxia (**fig. 27 f**). El resveratrol, como se había visto en un estudio previo, inhibe el 100% de la respiración en normoxia (**fig. 27 b**), indicando que este antioxidante bloquea la vía clásica, pero además en este ensayo podemos observar que también ocurre lo mismo en hipoxia (**fig. 27 d**), lo que demuestra que está actuando también sobre la vía alternativa.



**Figura 27:** Análisis polarográficos del consumo de oxígeno por ciliados (c) de *Philasterides dicentrarchi* cultivados durante 2 días, en fase de crecimiento exponencial, bajo condiciones de normoxia (a, b y e) e hipoxia (c, d y f). Los ensayos fueron realizados sobre ciliados permeabilizados con DIG a los que se le estimuló la respiración mediante la adición de los inductores S, G y ADP y posteriormente se le adicionaron los inhibidores AMA, RESV y PG a una concentración de 100  $\mu$ M. Los valores indicados sobre las gráficas indican el consumo medio de O<sub>2</sub> (nmol/mL) obtenido a partir de 3 ensayos individuales. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de inhibición en cada tramo.

## 2.2.- Efecto del PG sobre la expresión de la AOX

Se analizó el efecto del PG, un inhibidor de la AOX alternativa, sobre los niveles de la AOX en *P. dicentrarchi*. Las concentraciones empleadas fueron de 6,25, 12,5 y 25  $\mu$ M y se dejaron actuar sobre los cultivos durante 2 horas bajo condiciones de normoxia. El ensayo se realizó con extractos de proteínas totales del ciliado en condiciones reductoras, frente a un anticuerpo policlonal anti-AOX. Se observó un incremento dosis dependiente en los niveles de AOX (**fig. 28**).

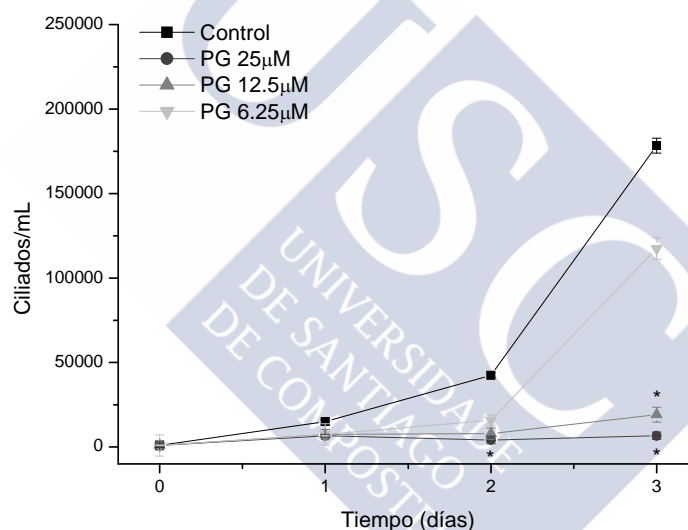
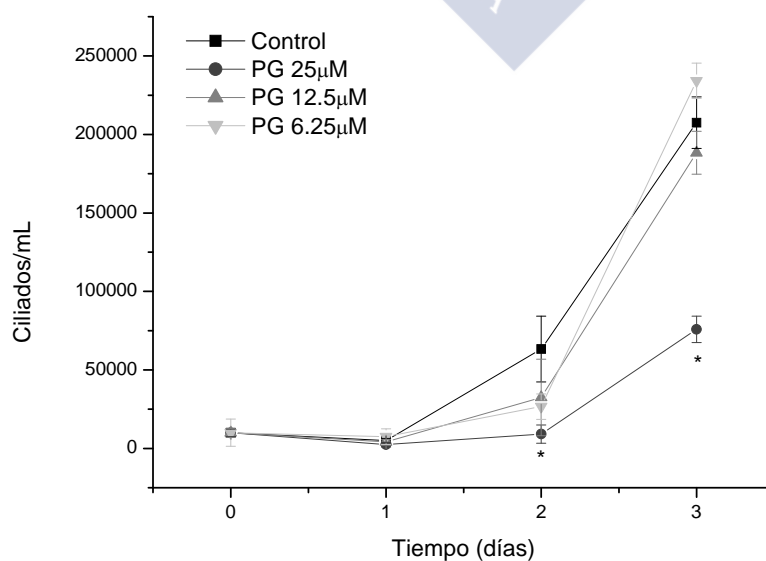


**Figura28:** Western blot mostrando los niveles de AOX en extractos totales de *P. dicentrarchi* utilizando condiciones reductoras. 1: control sin PG; 2: ciliados con PG 6,25 $\mu$ M; 3: ciliados con PG 12,5  $\mu$ M; 4: ciliados con PG 25  $\mu$ M. PM: Marcador de peso molecular en kDa. El recuadro indica la banda que se regula con la expresión de la AOX.

## 2.3.- Efecto de PG y AMA sobre el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi*

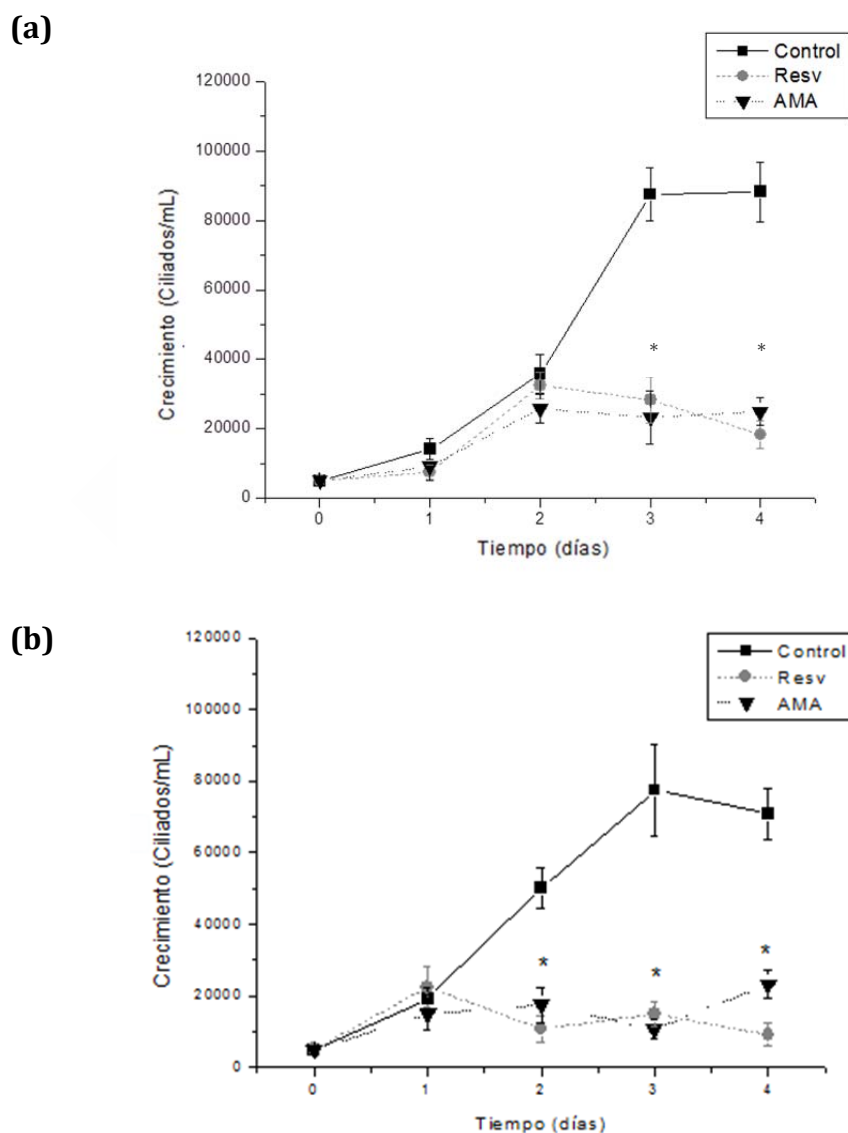
Se estudió el efecto del PG sobre ciliados crecidos en medio L-15 suplementado con un 10% de FBS, durante 3 días, en condiciones de

normoxia **(a)** e hipoxia **(b)**. Como puede observarse en la **figura 29**, el PG inhibe el crecimiento a partir del segundo día de cultivo, observándose una mayor inhibición en los cultivos en normoxia. Para el caso de la AMA, el crecimiento se ve inhibido también en ambas condiciones de cultivo (**fig. 30**), al igual que sucede con el PG y RESV, mostrando una efectividad similar en ambas condiciones de cultivo. Las concentraciones empleadas en la comparación de efecto inhibitorio de crecimiento fueron: 50  $\mu\text{M}$  RESV, 50  $\mu\text{M}$  AMA.

**(a)****(b)**

## Resultados

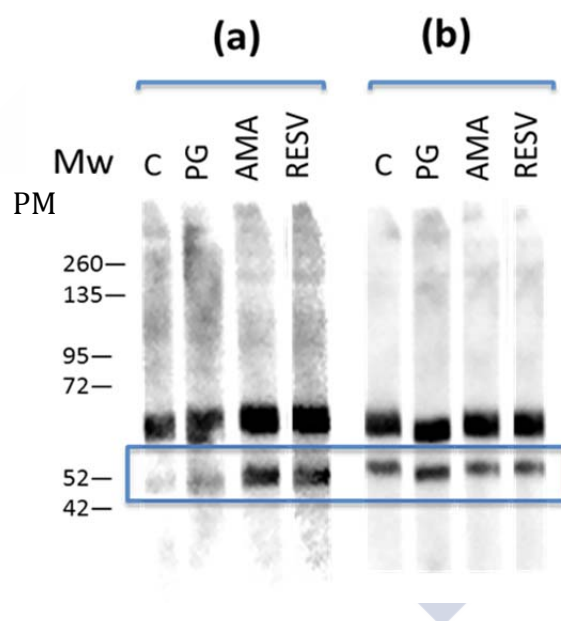
**Figura 29:** Efecto dosis-dependiente del propilgalato sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *Philasterides dicentrarchi* durante la fase exponencial en cultivos en normoxia (IC<sub>50</sub>: 9,7µM, a día 3) (a) e hipoxia (IC<sub>50</sub>: 9,7µM, a día 3) (b). \*Significativamente diferentes del control ( $P<0,01$ ), ( $n= 5$ ).



**Figura 30:** Efecto del PG, la AMA y el RESV sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *Philasterides dicentrarchi* durante 4 días en cultivos en normoxia (a) e hipoxia (b). Las concentraciones empleadas fueron de 50 µM RESV, 50 µM AMA \*Significativamente diferentes del control ( $P<0,01$ ), ( $n= 5$ ).

## 2.4.- Efecto de los antioxidantes PG y RESV sobre la expresión de la AOX

Extractos de ciliados, en la fase exponencial de crecimiento (día 3) y mantenidos bajo condiciones de normoxia (**fig. 31 a**) e hipoxia (**fig. 31 b**), fueron incubados durante 4 horas con los antioxidantes PG y RESV o con el inhibidor estándar de la vía clásica, AMA. En condiciones de normoxia, la concentración de AOX se incrementó en los ciliados tratados con inhibidores, siendo este incremento especialmente evidente en los ciliados tratados con AMA o con RESV (**fig. 31 a**). Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia, los niveles de AOX fueron similares en los cuatro grupos testados (**fig. 31 b**).

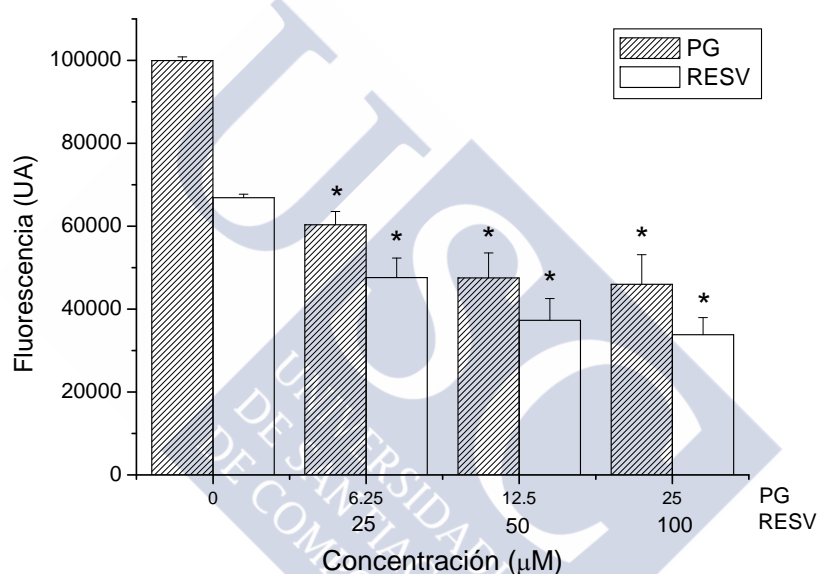


**Figura 31:** Western blot anti-AOX; **(a)** normoxia; **(b)** hipoxia, de ciliados tratados durante 4 h con los inhibidores PG, RES y AMA a la concentración de 100  $\mu$ M. C: control sin inhibidores. El recuadro indica la banda correspondiente a la AOX de *P. dicentrarchi*. PM indica el marcador de peso molecular de proteínas en kDa.

## 2.5.- Efecto de los antioxidantes sobre el potencial de membrana mitocondrial

Para estudiar el efecto de los antioxidantes sobre el potencial de membrana mitocondrial, los cultivos de ciliados, en fase exponencial de

crecimiento (día 3) y en condiciones de normoxia, se incubaron con diferentes dosis de PG (6,25, 12.5 y 25  $\mu\text{M}$ ) y RESV (25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ), durante 2 horas, tras las cuales se determinó el potencial de membrana ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) de los trofozoitos incubados con ambos antioxidantes, mediante el empleo de la sonda JC-1 (ioduro 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetil-benzimidazol-carbocianina (JC-1) (**fig. 32**). Como puede observarse, el PG, al igual que el RESV, produce una alteración del potencial de membrana en el ciliado, incluso a la mínima dosis empleada.



**Figura 32:** Efecto del PG a concentraciones de 6,25, 12,5 y 25  $\mu\text{M}$ , y el RESV, a concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  sobre el potencial de membrana de un cultivo de 3 días de *P. dicentrarchi*, cultivados bajo condiciones de normoxia, cuantificado empleando la sonda lipofílica catiónica ioduro 5,5',6, 6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetil-benzimidazol-carbocianina (JC-1). Los ciliados se incubaron durante 2 horas con los tratamientos. Los resultados están expresados en unidades de fluorescencia arbitrarias (UA). Las barras del histograma muestran las medias  $\pm$  errores estándar ( $n=5$ ). \*  $P < 0,01$ .

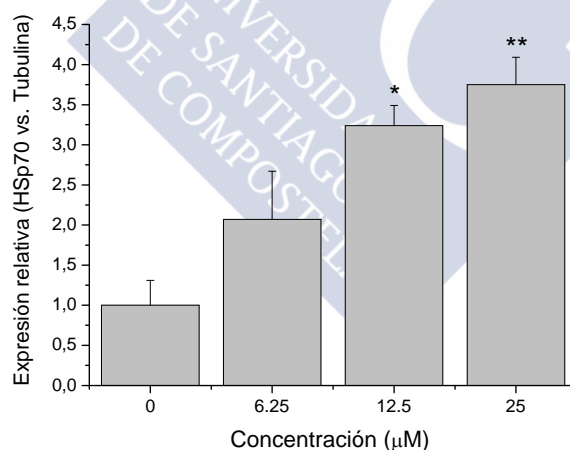
## 2.6.- Efecto de los antioxidantes sobre la expresión de chaperonas Hsp70

Se determinó cómo afectaba el PG a la expresión del gen Hsp70, que codifica proteínas de choque térmico, mediante RT-qPCR, en ciliados cultivados en condiciones de normoxia y al tercer día de cultivo. Los

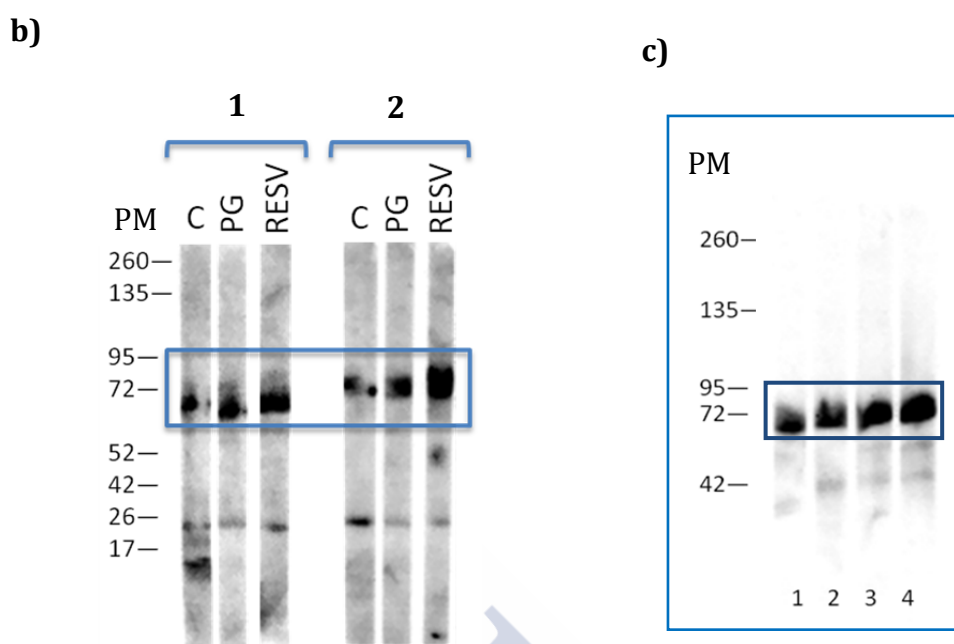
resultados se muestran en la **figura 33 a)**. Los niveles de Hsp70 se determinaron también mediante Western blot en ciliados tratados con 25  $\mu$ M de PG y 100  $\mu$ M de RESV (**fig. 33b**), en ciliados cultivados bajo condiciones de normoxia (**fig. 33b, 1**) o hipoxia (**fig. 33b, 2**). La incubación con PG causó un incremento en la expresión del gen de las Hsp70, de un modo dosis dependiente (**fig. 33 a**), al igual que ocurrió para el caso de los extractos de proteína total de ciliados incubados con ambos tratamientos y en similares condiciones.

También se investigó el efecto de diferentes dosis de PG sobre los niveles de expresión proteica sobre la Hsp70. Esto se realizó mediante el empleo de extractos totales de proteína de ciliados cultivados durante 2 horas en condiciones de normoxia con diferentes concentraciones de PG: 6,25, 12,5 y 25  $\mu$ M. Se observó un incremento dosis dependiente en la expresión de Hsp70 al igual que se observa mediante RT-qPCR (**figura 33c**).

a)



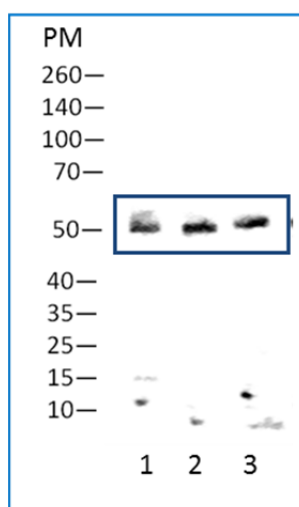




**Figura 33:** a) Expresión de las proteínas de choque térmico (Hsp70) cuantificada mediante RT-qPCR, empleando el gen de la  $\beta$ -tubulina como gen de referencia para la normalización de los datos de expresión génica. El análisis relativo se realizó mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  y cada barra vertical representa la media  $\pm$  el error estándar. \* indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles sin tratar, de ciliados incubados in vitro durante 2 h con diferentes concentraciones de PG. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$   $n = 3$ . b) Análisis de la expresión de Hsp70 mediante Western blot con extractos totales de ciliados incubados durante 4 h con PG y RESV, a unas concentraciones de 25 y 100  $\mu$ M, respectivamente, en condiciones de normoxia (1) e hipoxia (2) incubados con un anticuerpo anti Hsp70. C, indica los controles sin tratar. El recuadro indica la banda correspondiente a la Hsp70. PM: marcador de peso molecular de proteínas en kDa. c) Análisis de expresión de Hsp70 mediante Western blot sobre extractos totales de ciliados incubados durante 2 horas en condiciones de normoxia con diferentes dosis de PG: 1: control sin PG, 2: PG 6,25  $\mu$ M; 3: PG 12,5  $\mu$ M; 4: PG 25  $\mu$ M.

## 2.7.- Expresión de la AOX en diferentes cepas de *P. dicentrarchi*.

Para ver si el patrón de expresión de la AOX varía en función de las cepas, se emplearon extractos de proteína de membrana de 3 cepas diferentes en condiciones reductoras frente a un anticuerpo policlonal anti-AOX. Como puede observarse en la **figura 34**, el patrón de expresión no varía entre las tres cepas testadas, observándose una única banda en torno a 50 kDa.



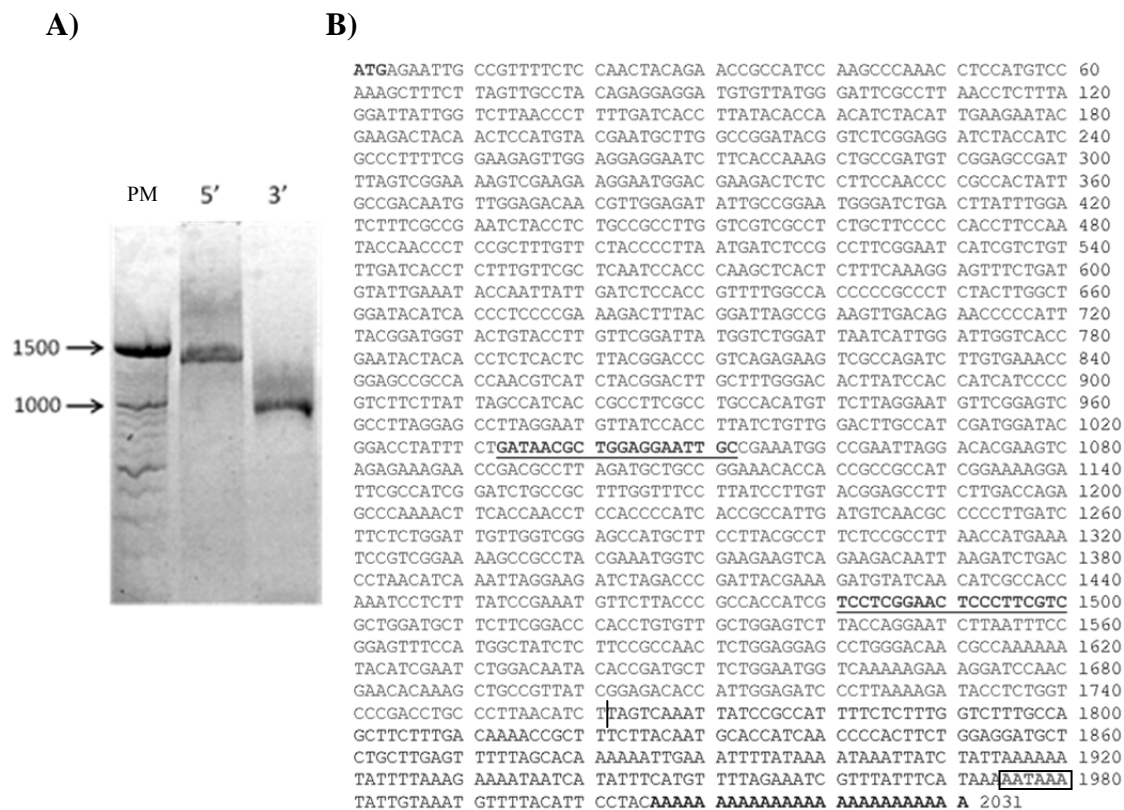
**Figura 34:** Western blot en el que se muestra los niveles de AOX en tres cepas de *P. dicentrarchi*, realizado con extractos proteicos de membrana en condiciones reductoras. 1: Cepa C1; 2: Cepa D3, 3: Cepa I1. PM: Marcador de peso molecular en kDa. El recuadro marca la banda correspondiente a la AOX.

### 3.- Estudio de la existencia de una $H^+$ -PPasa en *P. dicentrarchi* y su función como posible diana quimioterapéutica.

#### 3.1.- Identificación de ADNc que codifica para una pirofosfatasa en *P. dicentrarchi*

Tras la secuenciación de algunos de los genes obtenidos a partir de una biblioteca de ADNc de *P. dicentrarchi* previamente construida y su análisis por similitud de secuencia (BLAST) en las bases de datos, se encontró una colonia que contenía una secuencia que mostraba una alta homología con el gen de la  $H^+$ -PPasa; sin embargo, esta secuencia era parcial. Se diseñó una pareja de cebadores en un sitio interno con el objetivo de amplificar la secuencia entera del gen mediante amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) (**fig. 35**). La secuencia de ADNc completo obtenido tiene 2031 pb con un ORF de 1761pb (**fig. 35B**), conteniendo el codón de iniciación ATG y finalizando con 26-pb de una cola de poli(A)<sup>+</sup> 25pb aguas abajo desde la

secuencia AATAAA, una secuencia consenso señal de poliadenilación de eucariotas (**fig. 35B**).



**Figura 35: A)** Gel de agarosa al 1 % mostrando los productos resultantes de una RACE-PCR (rapid amplification ends ADNc) de la  $H^+$ -PPasa de *Philasterides dicentrarchi* ( $H^+$ -PPasa) hacia el extremo 5' y 3'. PM: Marcador de peso molecular. **B)** Secuencia nucleotídica completa de ADNc correspondiente a la  $H^+$ -PPasa en la cual las bases nucleotídicas a partir de la barra se corresponden con el ORF, y las subrayadas son los oligonucleótidos usados para la amplificación por RACE. La región 3' final, contiene una cola de poli-A de 26 pares de bases (en negrita) y una señal de poliadenilación de eucariotas (recuadro).

### 3.2.- Caracterización de la $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi*

El ORF entero del ADNc de la  $H^+$ -PPasa codifica una secuencia de 587 aminoácidos, prediciendo un polipéptido de 61666-Da con un punto isoeléctrico de 5.0 (**fig. 36C**). La predicción en el servidor NetNES 1.1 indica que la proteína tiene siete señales de exportación nuclear ricas en leucina (MES) en los residuos 43-47, 49 y 51. Las predicciones para sitios de fosforilación de serina (S), treonina (T) y tirosina (Y) usando el servidor

NetPhos 2.0 indican que la proteína tiene 19 sitios de fosforilación en S, 5 sitios en T y 10 sitios en Y. Se predijeron también 2 sitios potenciales para N-glicosilación (372 y 403).

De acuerdo con el programa Signal-3L, la proteína contiene un péptido señal en las posiciones 1-15 y un péptido de diana mitocondrial en la posición 1-30 (iPSORT prediction, **fig. 36A**). La secuencia proteica contiene un loop con un residuo de 57 aminoácidos con tres motivos característicos de la H<sup>+</sup>-PPasa subrayados en la siguiente secuencia en posición 86-143:

**VGGGIFTKAADDVGADLVGKVEEGMDEDSPSNPATIADDNVGDN  
VGDIAGMGSDLFGSF (**fig. 36A**).**

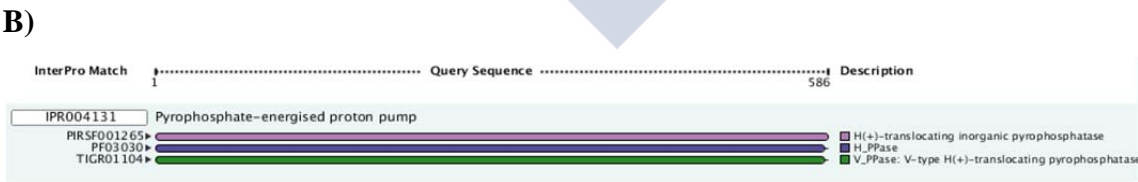
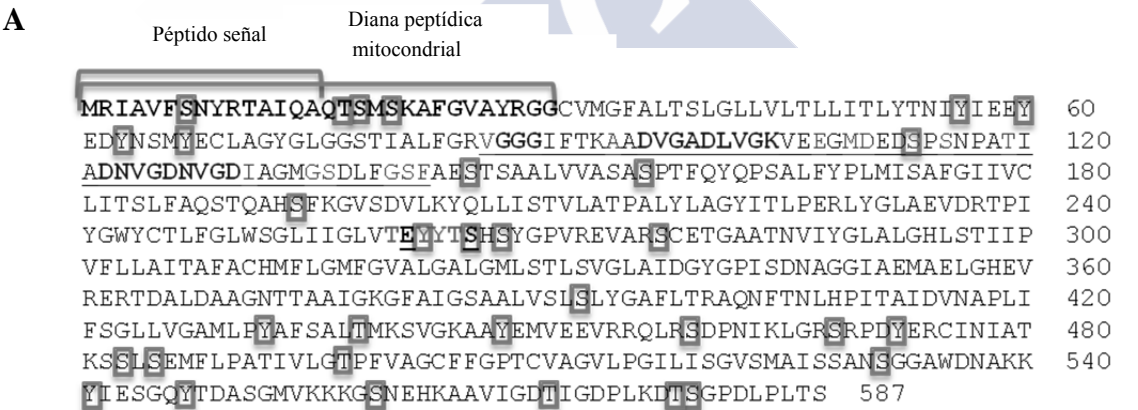
En la posición 260-265 se localiza el motivo [T (ácido) YYT (neutro)], que contiene aminoácidos, neutro, serina (S) y ácido, ácido glutámico (E), típicos de V-H<sup>+</sup>-PPasas dependientes de K<sup>+</sup>. La presencia de una alanina (A) en la posición 375, que determina la dependencia de K<sup>+</sup>, confirma que se trata de un enzima de este tipo (**fig. 36A**).

Para detectar miembros de unión a membrana de la familia de bombas de protones, H<sup>+</sup>-PPasas, se realizó una búsqueda empleando la información obtenida del programa InterPro Scan del EMBL,-EBI, una herramienta bioinformática diseñada para el análisis funcional de proteínas. Este método reveló que esta secuencia de proteína comparte un alto grado de similitud de secuencia con la familia de proteínas pirofosfatasas, bombas de protones energéticas, entre los nucleótidos 1 y 583 (de acuerdo con el método de búsqueda PFAM del instituto Sanger) con un valor (*match*) de 6.9E-223.

Cuando se llevó a cabo la búsqueda en la base de datos Comprehensive Microbial Resource (CMR), se obtuvo la predicción de una secuencia de 1-583 aminoácidos para nuestra secuencia con proteínas pertenecientes a la familia V-PPasa con un match de 3.5E-227 (**fig. 36B**). Todos los motivos de la secuencia son residuos conocidos por ser característicos de las V-PPasas de tipo I están conservados en la H<sup>+</sup>-PPasa.

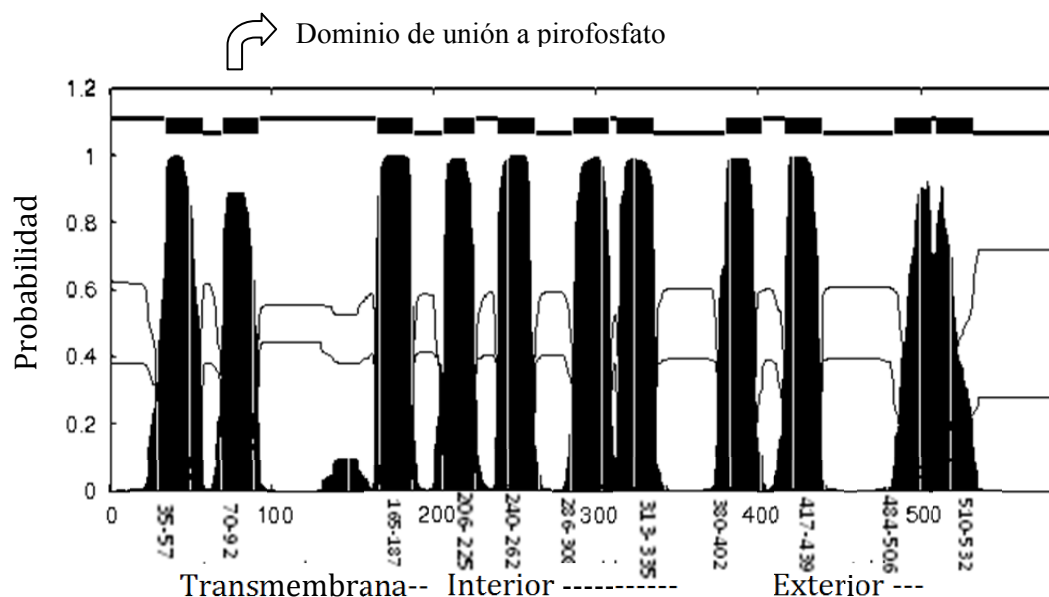
# Resultados

La secuencia proteica tiene 4 motivos característicos de la pirofosfatasa vacuolar de tipo I de *Arabidopsis* (AVP-1): el motivo EYYTS localizado entre los sitios 206-265, el motivo DG(A)YGPISDNAGGIAEMA localizado entre los sitios 338-354 que presenta una sustitución simple del aminoácido glicina (G) por el aminoácido alanina (A) en posición 2; el motivo GGAWDNAKKYIE localizado entre los sitios 532-543 y el motivo HKAAVIGDTIGDPLKDT localizado entre los sitios 562-578 (**fig. 36A**). El modelo topológico de la H<sup>+</sup>-PPasa predicho por el programa de predicción de hélices transmembrana en proteínas, THHMM, indica que la proteína tiene 11 regiones de hélices transmembrana localizadas entres los sitios 35-57, 70-92, 165-187, 206-225, 240-262, 286-308, 313-335, 380-402, 417-439, 484-506, 510-532 (**fig. 36C**).

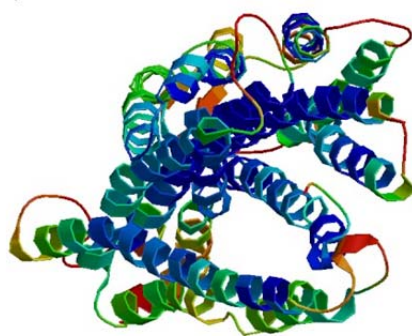


IPR004131 Pyrophosphate-energised proton pump			
Method	Identifier	Description	Matches
PIR	PIRSF001265	H(+)-translocating inorganic pyrophosphatase	3.0E-228 [1-586] T
PFAM	PF03030	H_PPase	6.9E-223 [1-583] T
TIGRFAMs	TIGR01104	V_PPase: V-type H(+)-translocating pyrophosphatase	3.5E-227 [1-583] T

C)



D)



Peso molecular: 61665.9; pI: 5.00

**Figure 36:** A) Secuencia aminoacídica de la pirofosfatasa obtenida el código genético de ciliados. Según las predicciones de Signal-3L y iPSORT, los 15 aminoácidos iniciales funcionan como un péptido señal y los 30 aminoácidos iniciales se corresponden con una diana peptídica mitocondrial, respectivamente. En la segunda y tercera fila, el residuo de los 57 aminoácidos indicado en negrita contiene tres motivos (subrayados) típicos de  $H^+$ -PPasas. La presencia del motivo T[neutro]YYT[ácido] en el quinto renglón, que contiene el aminoácido ácido E y el neutro S, indica que esta secuencia pertenece a una  $H^+$ -PPasa  $K^+$ -dependiente de tipo I. En el séptimo renglón de la secuencia, indicado en negrita y subrayado, existe un dominio altamente conservado, GNTAAA, que contiene la forma A relacionada con la dependencia al  $K^+$ . En las líneas 5, 7 y 9 están indicadas en negrita y subrayadas las secuencias conservadas predichas para el arquetipo pirofosfatasa vacuolar (V-PPasa) de tipo 1 de *Arabidopsis* (AVP-1). Los epitopos conservados para el anticuerpo policlonal PAB<sub>HK</sub> están incluidos en el recuadro. B) Predicción funcional de la familia de proteínas a la cual pertenece la secuencia usando la herramienta bioinformática InterPro Scan. C) Predicciones topológicas de



las hélices transmembrana y localización de los dominios de unión al PPi. **D)** Modelado y predicción del peso molecular y del punto isoeléctrico, empleando el servidor Swiss-Model y la herramienta ProtParam. Los lugares de fosforilación en la secuencia se representan en azul (serina), verde (treonina) y rojo (tirosina).

### 3.3.- Análisis filogenético de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi*

Para la comparación de las H<sup>+</sup>-PPasas de los ciliados *Tetrahymena thermophila*, *Paramecium tetraurelia*, *Ichthyophthirius multifiliis* y *P. dicentrarchi* se ha realizado un alineamiento múltiple de secuencias analizando 5 segmentos conservados (SC) característicos de V-PPasas de *Arabidopsis* (AVP1 y AVP2), de *Rhodospirillum rubrum* (RVP) y de *Pyrobaculum aerophilum* (PVP) (**fig. 37A**).

La secuencia aminoacídica de la H<sup>+</sup>-PPasa presenta residuos idénticos a la AVP1 en el SC2 (motivo EYYTS), en el SC4 (motivo GGAWDNAKKYIE) y en el motivo SC5 (HKAAVIGDTIGDPLKDT); sin embargo, posee muchos cambios con respecto al patrón de AVP1 en los residuos correspondientes a SC1 y solo un cambio (A/G) en el SC3 (**fig. 37A**).

Las secuencias aminoacídicas de otras especies de ciliados analizadas también exhiben esencialmente el mismo tipo de patrón de secuencia AVP1 en varios SC, excepto en el caso del SC3 y SC5 teniendo un patrón de secuencia tipo PVP/PVP y RVP, respectivamente (**fig. 37A**).

Cuando comparamos la secuencia de la H<sup>+</sup>-PPasa con las secuencias de H<sup>+</sup>-PPasa de especies de ciliados en la base de datos, se consigue la identidad más alta con la H<sup>+</sup>-PPasa de *T. thermophila* (73%), seguida por la H<sup>+</sup>-PPasa de *I. multifiliis* (71%) y la de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. tetraurelia* (69%) (**fig. 37B**).

Se ha construido el árbol filogenético de la familia de las H<sup>+</sup>-PPasas usando el método de Neighbor Joining (NJ) y la confianza del orden de ramificación fue verificada realizando 1000 réplicas bootstrap con el programa MEGA 5 (**fig. 37**). Los árboles de NJ revelan que las H<sup>+</sup>-PPasas del ciliado representan un grupo relacionado pero separado de las PPasas de

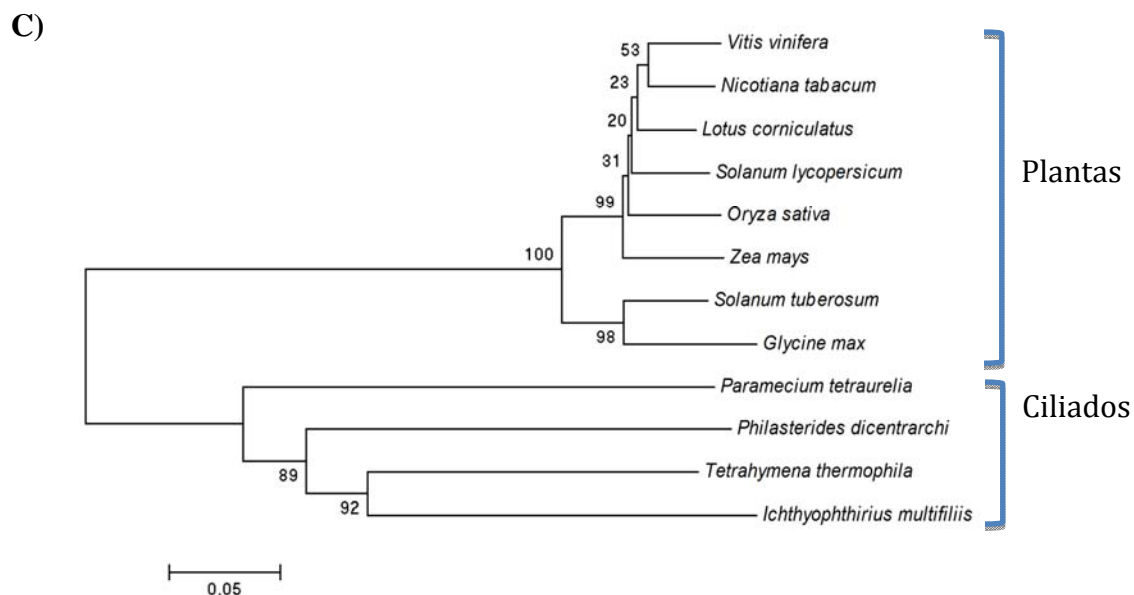
plantas. Dentro del subgrupo de los ciliados, las H<sup>+</sup>-PPasas de *T. thermophila* y *I. multifiliis* están más relacionadas, mientras que las H<sup>+</sup>-PPasas de *P. dicentrarchi* y *P. tetraurelia* están filogenéticamente más distantes (**fig. 37C**).

[illegible]

**B)**

Origen de la PPasa	Nº acceso	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident.
<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001020551.1	878	878	99%	0.0	73%
<i>Ichthyophthyrus multifiliis</i>	XP_004030525.1	834	834	99%	0.0	71%
<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001428883.1	820	820	99%	0.0	69%



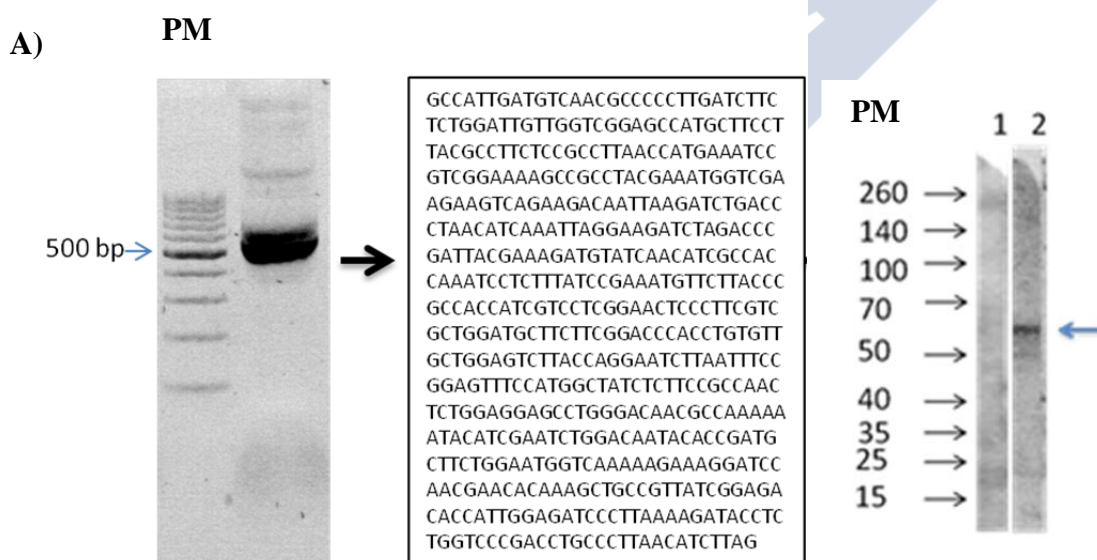


**Figura 37:** **A)** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de las  $H^+$ -PPasas de los ciliados *Philasterides dicentrarchi*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Tetrahymena thermophila* y *Paramecium tetraurelia*. Los residuos idénticos entre secuencias están marcados con asteriscos. Los guiones indican los huecos insertados para optimizar los alineamientos. Se han marcado 5 secuencias conservadas entre la pirofosfatasa de *Philasterides* y la pirofosfatasa vacuolar de tipo I de *Arabidopsis* (AVP I) (Los residuos idénticos se muestran en letras blancas con fondo negro). **B)** Especies de ciliados incluidas en el análisis filogenético, mostrando los números de acceso al GenBank para sus secuencias de aminoácidos y el porcentaje de identidad con la secuencia de aminoácidos de *P. dicentrarchi*. **C)** Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos alineadas de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* y otras especies de ciliados y plantas. La filogenia presentada está basada en alineamientos de secuencias de proteína usando el programa de alineamiento múltiple Clustal W2. El árbol filogenético basado en el método de Neighbor Joining (NJ), fue construido empleando el programa MEGA 5. Los números en los nodos representan los valores de bootstrap de 1000 valores en el análisis NJ con la corrección de 2 parámetros de Kimura. La escala indica la distancia de 0,05.

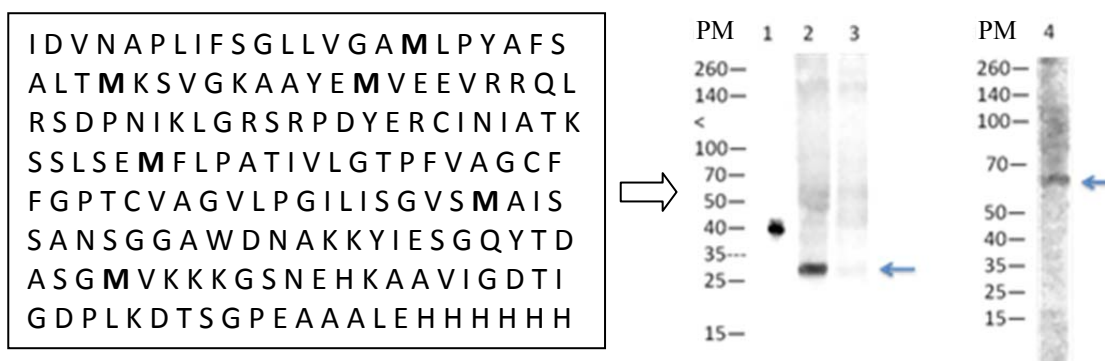
### 3.4.- Caracterización bioquímica de la $H^+$ -PPasa en *P. dicentrarchi*.

Para la caracterización bioquímica de la  $H^+$ -PPasa se procedió a generar anticuerpos de ratón obtenidos a partir de la inmunización genética con un fragmento de ADN, y de la inmunización con el fragmento de la proteína recombinante de la  $H^+$ -PPasa. La construcción plasmídica empleada para la inmunización genética fue un fragmento de ADN de 531 pb clonado en el vector de expresión de eucariotas pTarget, mientras que para producir la

proteína recombinante se empleó una construcción plasmídica clonando un fragmento de ADN de 507 pb en el vector pET-21d, codificando una proteína de 169 aminoácidos localizada entre los sitios 413 y 582 de la secuencia de la  $H^+$ -PPasa (**fig. 38**). Los anticuerpos producidos después de la inmunización genética reconoció una única banda de un tamaño de aproximadamente 60 kDa en Western blot realizado con un extracto total de proteínas de *P. dicentrarchi* (**fig. 38A**). En el caso de la proteína recombinante, inicialmente se testó que las células transformadas expresaran la proteína. Para ello se realizó un ensayo de Western blot sobre extractos totales de las bacterias usando el anticuerpo monoclonal anti-T7-Tag, que reconoció una única banda de unos 20 kDa correspondiente con el tamaño estimado para la proteína recombinante diseñada, incluyendo el péptido del vector de 14 aminoácidos conteniendo una secuencia His-tag (**fig. 38B, a**). Cuando se empleó el suero de ratones inmunizados con la proteína recombinante en Western blot sobre un extracto total de proteínas de *P. dicentrarchi*, también se observó una única banda de aproximadamente 60 kDa (**fig. 38B, b**).



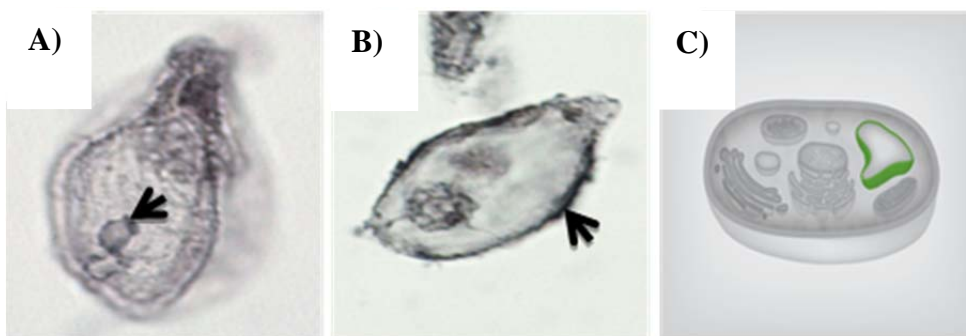
B)



**Figura 38:** Producción de anticuerpos anti H<sup>+</sup>-PPasa (H<sup>+</sup>-PPasa) en *P. dicentrarchi*. **A)** Representación esquemática de los pasos de la preparación de la construcción plasmídica en el vector pTargetT, conteniendo un fragmento de 531 pb localizado entre las posiciones 1233 y 1764 de la secuencia nucleotídica de la H<sup>+</sup>-PPasa. Una vez preparados los anticuerpos, fueron testados en Western blot sobre extractos de proteína totales de *P. dicentrarchi*. **1:** patrón de reconocimiento obtenido por el suero de la inmunización con el vector pTargetT frente al extracto total de proteínas de *P. dicentrarchi*; **2:** patrón de reconocimiento obtenido por los anticuerpos anti-pTargetT conteniendo el fragmento de la H<sup>+</sup>-PPasa, frente a las proteínas totales del ciliado. **B)** Representación esquemática de los pasos de preparación de la proteína recombinante producida a partir de una secuencia nucleotídica parcial de la H<sup>+</sup>-PPasa en el vector pET-21d. El inserto posee una secuencia de aminoácidos de la H<sup>+</sup>-PPasa clonada presentando una cola de 6 histidinas y el tamaño estimado es de 19 kDa. **a)** Patrón de inmunoreconocimiento por Western-blot utilizando el anticuerpo anti-T7-Tag **b)** patrón de inmunoreconocimiento por Western blot empleando el anticuerpo policlonal anti-H<sup>+</sup>-PPasa recombinante. **1:** proteína de fusión β-galactosidasa T7-Tag; **2:** Extracto total de *E. coli* expresando la proteína de fusión T7-tag; **3:** extractos totales de *E. coli* expresando la proteína de fusión T7-tag frente a un suero normal de ratón; **4:** proteínas totales de *P. dicentrarchi*. PM: marcador de peso molecular en kDa.

### 3.5.- Localización subcelular de la H<sup>+</sup>-PPasa en *P. dicentrarchi*.

Para estudiar la localización de la H<sup>+</sup>-PPasa en el ciliado, se realizó un análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-H<sup>+</sup>-PPasa recombinante, empleándolo a una dilución 1:50. Éste produjo una tinción intensa tanto en las membranas de las vacuolas (**fig. 39A**) como en las membranas de los sacos alveolares (**fig. 39B**). Como puede observarse, la localización subcelular coincide con la predicción bioinformática de localización para esta proteína.



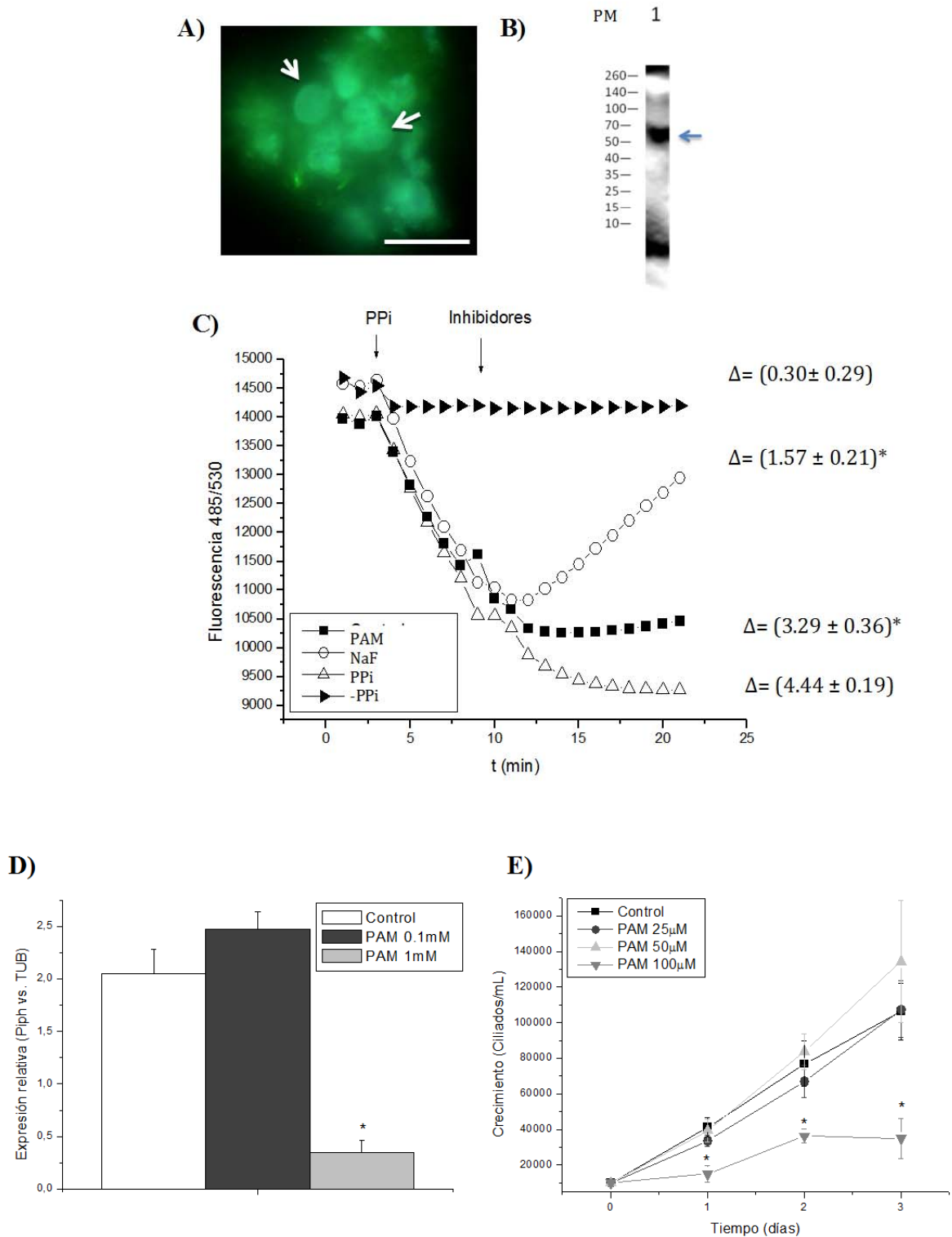
**Figura 39:** Inmunolocalización de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* ( $H^+$ -PPasa). El estudio de la localización celular de la  $H^+$ -PPasa fue llevado a cabo mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal anti- $H^+$ -PPasa recombinante. La tinción del anticuerpo anti- $H^+$ -PPasa se localiza en la membrana de algunas vacuolas (A) y en la membrana de los sacos alveolares (B). Predicción de la localización según la secuencia de la  $H^+$ -PPasa en la membrana vacuolar empleando la herramienta bioinformática LocTree2 (C). Las flechas indican el marcaje en las vacuolas (A) y en la membrana de los sacos alveolares.

### 3.6.- Efecto del NaF y los análogos del pirofosfato en la translocación de $H^+$ dependiente de PPi y en la expresión génica.

Para comprobar la actividad de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi*, se realizó un ensayo de translocación de  $H^+$ , dependiente de PPi, para lo cual se empleó una fracción de trofozoitos de *P. dicentrarchi* enriquecida en vacuolas, las cuales resultaron marcadas con los anticuerpos anti-PPasa, como se demostró por inmunofluorescencia (**fig. 40 A**) y Western blot (**fig. 40 B**) empleando el anticuerpo de la  $H^+$ -PPasa recombinante. La acidificación vacuolar inducida por PPi en las fracciones enriquecidas en vesículas de *P. dicentrarchi* se monitorizó empleando el colorante naranja de acridina en un medio conteniendo NaF 1mM, un inhibidor clásico de las  $H^+$ -PPasas y PAM 0.1mM, un análogo del PPi (**fig. 40 C**), que además resultó inhibir el crecimiento del ciliado *in vitro* (**fig. 40 E**). La adición de PPi produjo un decrecimiento significativo en la fluorescencia, indicando un incremento en la acidificación de las vacuolas (**fig. 40 C**). La adición de NaF y PAM a l medio de reacción al que previamente se le había añadido PPi produjo una inhibición significativa en la acidificación de las vacuolas con respecto al control sin inhibidores (**fig. 40 C**), pero no afectó a los niveles de fluorescencia en los

## Resultados

ensayos en los cuales el PPI no había sido añadido previamente. También se empleó el método de RT-qPCR para analizar el efecto de los bisfosfonatos sobre la expresión génica de la  $H^+$ -PPasa y se observó que el PAM inhibió significativamente la expresión del gen con respecto a los controles (**fig. 40 D**)





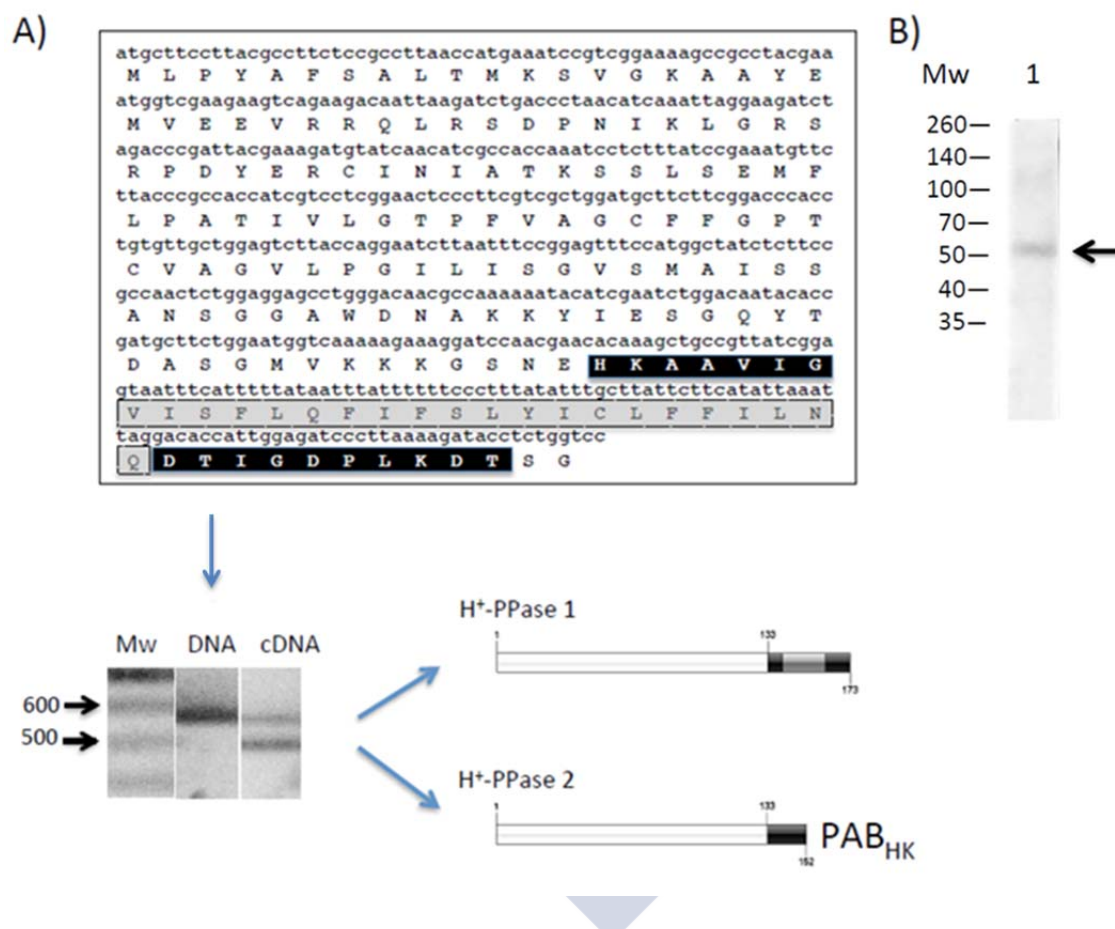
**Figura 40:** **A)** Fotomicrografía de una inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo recombinante anti-H<sup>+</sup>-PPasa sobre una fracción de trofozoitos de *P. dicentrarchi* enriquecida en vacuolas (las flechas muestran las vacuolas marcadas). Escala = 5µm. **B)** Western blot con el anticuerpo recombinante policlonal anti-H<sup>+</sup>-PPasa. **C)** Translocación de H<sup>+</sup> dependiente de PPI en una fracción enriquecida en vacuolas de trofozoitos de *P. dicentrarchi* con el ΔpH medido con el colorante fluorescente naranja de acridina, en presencia de los inhibidores NaF, a 1 mM y el análogo del PPI, PAM, a 0.1 mM. **D)** Niveles de expresión génica de la H<sup>+</sup>-PPasa determinados por RT-qPCR en presencia del análogo del PPI, PAM, a las concentraciones que se muestran en la gráfica. La expresión génica fue normalizada con el gen de referencia β-tubulina de *P. dicentrarchi* y los datos normalizados se expresaron en unidades arbitrarias. Los valores que se muestran representan la media ± error estándar ( $n = 5$ ). \*  $P < 0,01$  relativo al control. **E)** Efecto antiparasitario del análogo del pirofosfato, PAM, sobre cultivos *in vitro* de *P. dicentrarchi* en medio L-15 con un 10% de FBS, durante 3 días. Los valores que se muestran se corresponden con las medias ± error estándar ( $n = 5$  ensayos) del número de trofozoitos/mL. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  con respecto al control. La IC<sub>50</sub> del PAM a día 3 fue de 84 µM.

## 4.- Caracterización y papel fisiológico de una isoforma de la H<sup>+</sup>-PPasa localizada en los sacos alveolares de *P. dicentrarchi*

### 4.1.- Características de la secuencia de las isoformas de la H<sup>+</sup>-PPasa

Para investigar la posible existencia de varios tipos de H<sup>+</sup>-PPasas en *P. dicentrarchi*, al igual que se ha observado en otros parásitos, se clonó una secuencia de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi* a partir del ADNc y otra a partir de ADN, empleando la pareja de cebadores FPipH/RPipH. Tras la PCR y posterior electroforesis se obtuvo un doble bandeo en geles de agarosa del 4%, en la muestra amplificada a partir de ADNc. Las bandas obtenidas se secuenciaron, obteniéndose 2 tipos de secuencias con la misma pareja de cebadores, (**fig. 41 A**): una de 558 nucleótidos de tamaño, que resultó ser coincidente con la banda única obtenida en PCR a partir de ADN, y otra de 495 nucleótidos, en la que faltaban 63 nucleótidos de los contenidos en la banda de mayor tamaño. Al traducir a proteína la secuencia nucleotídica del fragmento de menor tamaño, se obtuvo la secuencia del dominio conservado de las H<sup>+</sup>-PPasas HKAAVIGDTIGDPLKDT, mientras que en la secuencia de mayor tamaño pudo observarse este dominio fragmentado por la inserción de

21 aminoácidos (**fig. 41 A**). Un anticuerpo policlonal generado en ratón frente al péptido sintético con la secuencia anteriormente descrita ( $PAB_{HK}$ ), reconoció en Western blot, sobre un extracto de proteínas de membrana de *P. dicentrarchi* (MAPs) una única banda de aproximadamente 60 kDa (**fig. 41 B**).

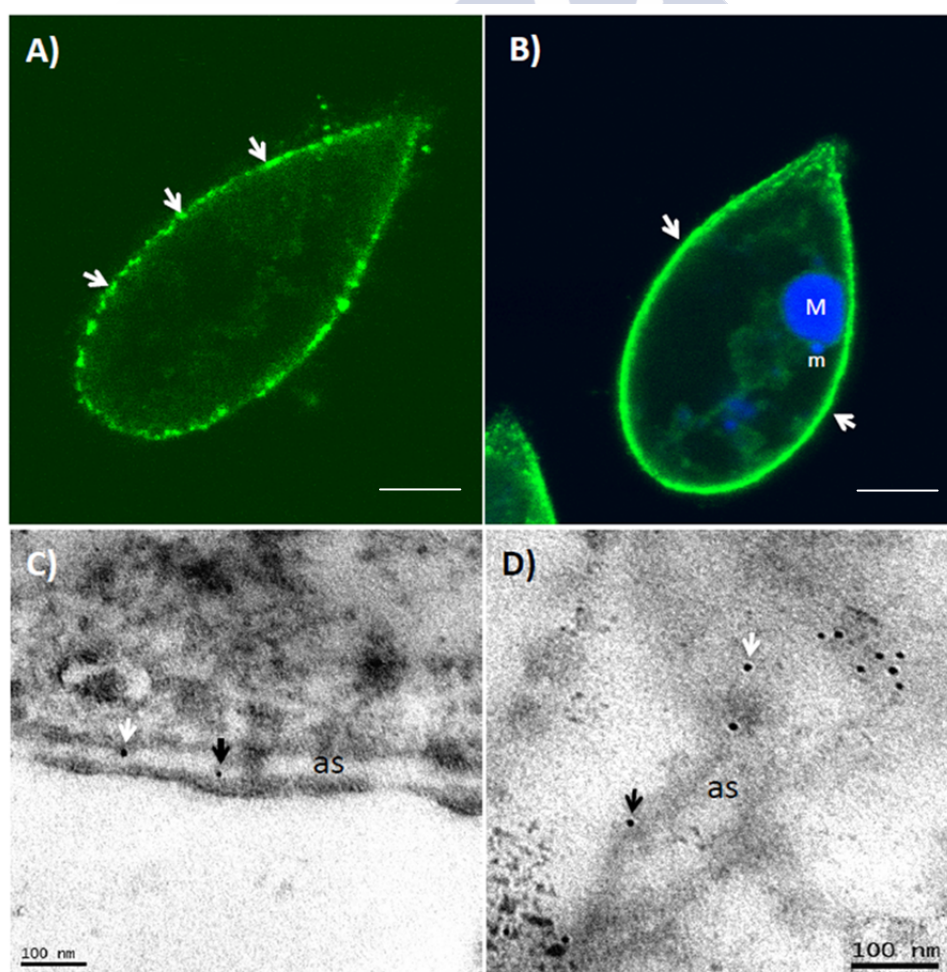


**Figura 41:** Bandas de amplificación obtenidas mediante PCR y RT-PCR utilizando la pareja de cebadores FPiPh / RPiPh sobre ADN genómico y ADNc, respectivamente, analizadas sobre un gel de agarosa al 4%. En el recuadro superior se muestra la secuencia nucleotídica, junto con su respectiva traducción a aminoácidos, de la banda de amplificación de mayor longitud obtenida mediante PCR utilizando ADNc como molde y que posee el mismo tamaño y secuencia nucleotídica que la única banda de amplificación obtenida sobre ADN genómico. A la derecha del gel de agarosa se esquematizan las estructuras de las proteínas correspondientes a las dos isoformas obtenidas (1 y 2) de la H<sup>+</sup>-PPasa conteniendo el motivo PAB<sub>HK</sub> fragmentado (H<sup>+</sup>-PPasa 1) y único (H<sup>+</sup>-PPasa 2). B) Análisis mediante inmunoblot con el anticuerpo PAB<sub>HK</sub> realizado sobre las proteínas de membrana de los trofozoítos y separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras. El inmunoblot muestra una única banda de reconocimiento (flecha). Mw: marcadores de peso molecular en kDa.



#### 4.2.- Marcaje inmunohistoquímico de la H<sup>+</sup>-PPasa con el anticuerpo policlonal (PAB<sub>HK</sub>)

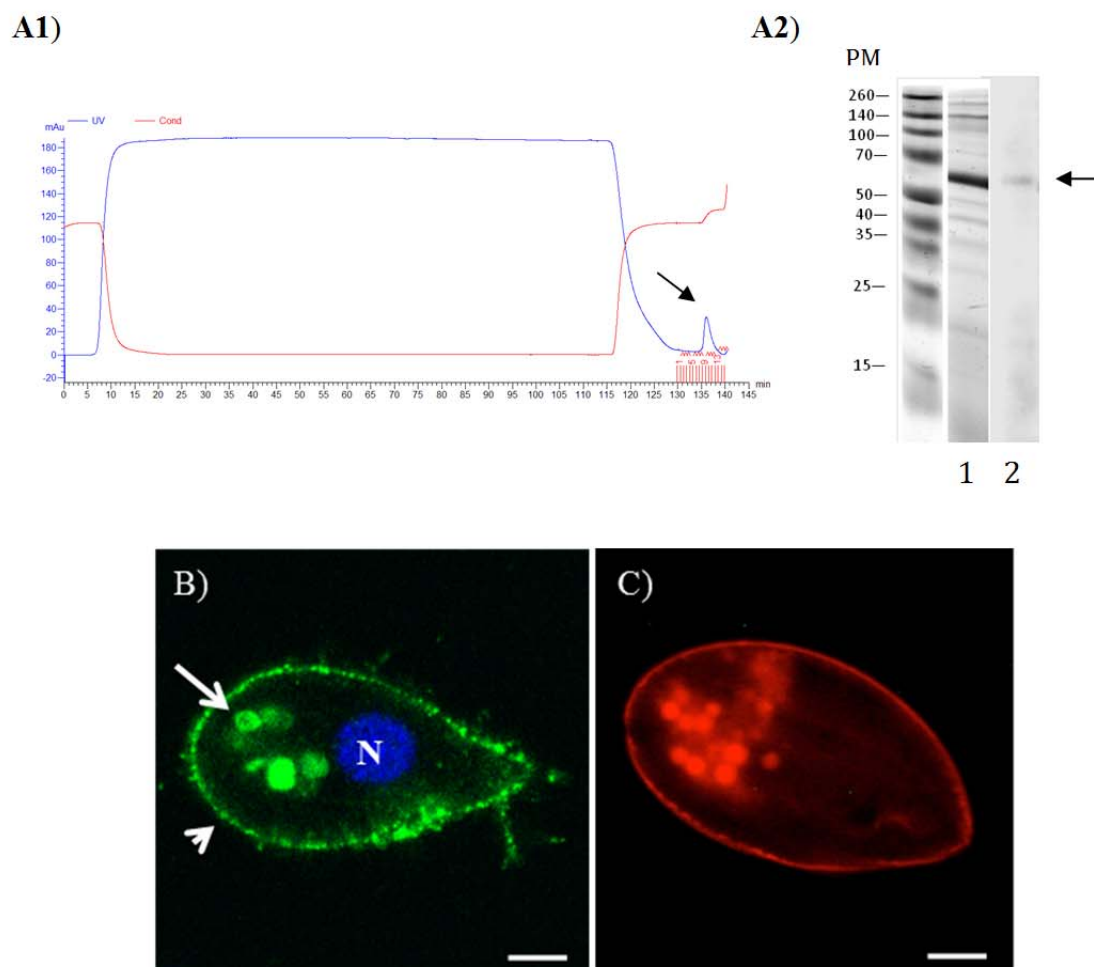
Empleando los anticuerpos realizados con el péptido sintético formado por la región conservada HKAAVIGDTIGDPLKDT, PAB<sub>HK</sub> y el anticuerpo policlonal de la AVP1 de *Arabidopsis thaliana*, que también contiene ese dominio conservado (**fig. 42 A y B**, respectivamente), se reveló, mediante inmunofluorescencia indirecta, un mismo marcaje en la superficie del parásito, en el que se aprecia un claro patrón punteado en los trofozoitos de *P. dicentrarchi*, correspondiente mayoritariamente a los sacos alveolares de la corteza. En el caso de la microscopia inmunoelectrónica (**fig. 42 C-D**) empleando el anticuerpo anti-AVP1 de *A. thaliana* se muestra claramente un marcaje específico en las membranas de los sacos alveolares.



**Figura 42.- A-B)** Detección por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal de la isoforma alveolar de la  $H^+$ -PPasa ( $H^+$ -PPasa 2) con el PAB<sub>HK</sub> **(A)** y anti-AVP1 **(B)**, en donde se puede observar un patrón de fluorescencia discontinuo en la superficie de los trofozoitos (flecha). Escala= 10  $\mu$ m. **(C-D)** Localización por inmunoelectromicroscopía de la isoforma alveolar ( $H^+$ -PPasa 2) usando el anticuerpo policlonal anti- AVP1 de *A. thaliana*, el cual también posee la secuencia conservada y muestra una tinción específica (flecha) en la membrana de los sacos alveolares.

### **4.3.- Inmunolocalización celular de la $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* en compartimentos ácidos**

El fragmento de ADNc que codifica para una secuencia de 169 aa localizados entre las posiciones 305 y 474 de la secuencia de aminoácidos de la  $H^+$ -PPasa (número de acceso al Genbank AHH28243), conteniendo también el dominio conservado HKAAVIGDTIGDPLKDT, fue clonado en el vector de expresión en levaduras YepFlag-1. La proteína recombinante se purificó por afinidad y se sometió a electroforesis para comprobar su tamaño, de aproximadamente 60 kDa (**fig. 43A**) al igual que con el anticuerpo empleado en la figura anterior. Los anticuerpos de ratón policlonales generados frente a este fragmento de la proteína recombinante mostraron reconocimiento en las membranas de las vacuolas localizadas en la parte posterior de los trofozoitos y las membranas de los sacos alveolares localizados justo por debajo de la membrana plasmática (**fig. 43B**), del mismo modo que se había observado con el anticuerpo recombinante producido en ratón (**fig. 39**), pero mostrando un mayor título, y por tanto un marcaje más intenso. Esto confirma la existencia de dos isoformas de la  $H^+$ -PPasa en el ciliado. La incubación de los trofozoitos con el colorante sensible al pH, Lysotracker Red DND-99, mostró una tinción intensa en las vacuolas y en los sacos alveolares (**fig. 43 C**).



**Figura 43:** **A)** Purificación de la proteína expresada en levaduras por cromatografía de afinidad y comprobación de su tamaño en electroforesis SDS-PAGE 15%. La flecha señala al pico correspondiente a la purificación **(1)**. Gel SDS- PAGE y Western blot anti H<sup>+</sup>-PPasa producida en levadura (dilución 1:200) frente a la proteína expresada en levaduras y purificada por cromatografía de afinidad: carril **1**: gel SDS-PAGE con la proteína purificada, carril **2**: Western blot frente a la proteína purificada **(2)**. Según los cálculos obtenidos con el programa Total Lab, la proteína tiene un tamaño de 58kDa. **B)** Detección por microscopía confocal de la distribución de la H<sup>+</sup>-PPasa en el ciliado *P. dicentrarchi* empleando un anticuerpo policlonal anti H<sup>+</sup>-PPasa recombinante expresada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y generado en ratón y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Después del ensayo de inmunofluorescencia, los trofozoitos fueron teñidos con DAPI para identificar el núcleo (N). La flecha indica la inmunolocalización de la H<sup>+</sup>-PPasa en las vacuolas y la presencia de tinción específica que aparece como una línea punteada coincidiendo con los sacos alveolares. **C)** Tinción con el colorante fluorescente Lysotracker Red DND-99 que muestra una intensa tinción de las vacuolas localizadas en la parte posterior del ciliado así como de los sacos alveolares. Escala = 10 µm.

#### 4.4.- Análisis filogenético de la H<sup>+</sup>-PPasa en 7 aislados de *P. dicentrarchi*

Con la finalidad de estudiar las relaciones filogenéticas entre las diferentes cepas de *P. dicentrarchi* que tenemos en el laboratorio, se compararon las secuencias obtenidas de la amplificación de ADN por PCR con la pareja de cebadores F/R Piph empleando el programa MEGA 5, tras haberlas alineado previamente con el programa Clustal Omega (**fig. 44 A**). Empleando el método de Neighbour Joining, se puede ver que 5 de los aislados (I1, B1, D3, P1 e S1), presentan un 100% de homología, mientras que D2 y C1 constituyen 2 grupos filogenéticamente diferentes (**fig. 44 B**) aunque se trata de una proteína altamente conservada.

A)

```

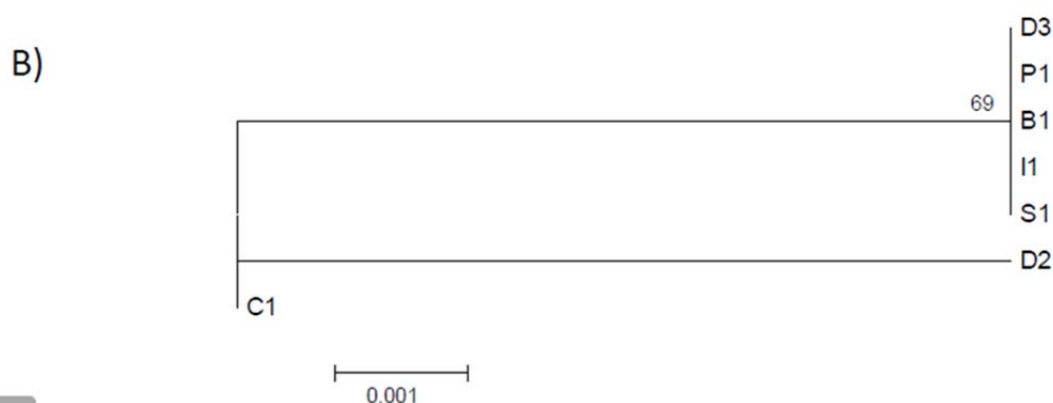
D2      MLPYAFSALTMKSVGKAAYEMVEEVRRQLRSDPNIKLGRSRPDYERCINIATKSSLSEMF
I1      MLPYAFSALTMKSVGKAAYEMVEEVRRQLRSDPNIKLGRSRPDYERCINIATKSSLSEMF
B1      MLPYAFSALTMKSVGKAAYEMVEEVRRQLRSDPNIKLGRSRPDYERCINIATKSSLSEMF
D3      MLPYAFSALTMKSVGKAAYEMVEEVRRQLRSDPNIKLGRSRPDYERCINIATKSSLSEMF
P1      MLPYAFSALTMKSVGKAAYEMVEEVRRQLRSDPNIKLGRSRPDYERCINIATKSSLSEMF
S1      MLPYAFSALTMKSVGKAAYEMVEEVRRQLRSDPNIKLGRSRPDYERCINIATKSSLSEMF
C1      MLPYAFSALTMKSVGKAAYEMVEEVRRQLRSDPNIKLGRSRPDYERCINIATKSSLSEMF
*****

D2      LPATIVLGTTPFVAGCFFGPTCVAGVLPGILISGVSMIAISSANSGGAWDNAKKYIESGQYT
I1      LPATIVLGTTPFVAGCFFGPTCVAGVLPGILISGVSMIAISSANSGGAWDNAKKYIESGQYT
B1      LPATIVLGTTPFVAGCFFGPTCVAGVLPGILISGVSMIAISSANSGGAWDNAKKYIESGQYT
D3      LPATIVLGTTPFVAGCFFGPTCVAGVLPGILISGVSMIAISSANSGGAWDNAKKYIESGQYT
P1      LPATIVLGTTPFVAGCFFGPTCVAGVLPGILISGVSMIAISSANSGGAWDNAKKYIESGQYT
S1      LPATIVLGTTPFVAGCFFGPTCVAGVLPGILISGVSMIAISSANSGGAWDNAKKYIESGQYT
C1      LPATIVLGTTPFVAGCFFGPTCVAGVLPGILISGVSMIAISSANSGGAWDNAKKYIESGQYT
*****

D2      DASGMVKKKGSNEHKA AVI SVISFFKFIFSLYICLFFILNQDTIGDPLKDTSG
I1      DASGMVKKKGSNEHKA AVI SVISFLQFIFSLYICLFFILNQDTIGDPLKDTSG
B1      DASGMVKKKGSNEHKA AVI SVISFLQFIFSLYICLFFILNQDTIGDPLKDTSG
D3      DASGMVKKKGSNEHKA AVI SVISFLQFIFSLYICLFFILNQDTIGDPLKDTSG
P1      DASGMVKKKGSNEHKA AVI SVISFLQFIFSLYICLFFILNQDTIGDPLKDTSG
S1      DASGMVKKKGSNEHKA AVI SVISFLQFIFSLYICLFFILNQDTIGDPLKDTSG
C1      DASGMVKKKGSNEHKA AVI SVISFLKFIFSLYICLFFILNQDTIGDPLKDTSG
*****

```

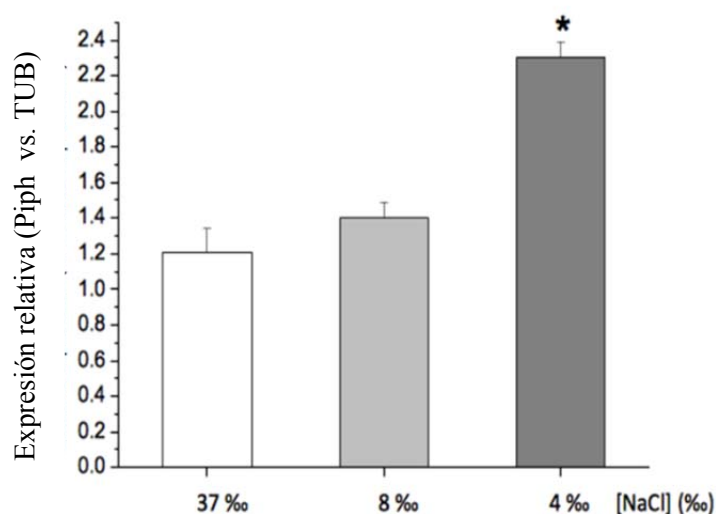




**Figura 44:** **A)** Alineamiento múltiple, empleando el programa Clustal Omega, de secuencias de aminoácidos obtenidas de una secuencia parcial de la ORF del gen de la H<sup>+</sup> PPasa de los aislados de *P. dicentrarchi* (B1, D2, C1, D3, I1, P1, y S1). Las secuencias marcadas en negrita indican el motivo de reconocimiento del PAB<sub>HK</sub>. **B)** Árbol filogenético comparando las secuencias de la H<sup>+</sup>-PPasa de 7 aislados de *P. dicentrarchi*. Las secuencias de aa fueron sometidas a un análisis filogenético con el método de Neighbor-Joining (NJ). Los números de los nodos representan los valores bootstrap resultantes de 1000 réplicas analizadas por NJ con el modelo de corrección de dos parámetros de Kimura.

#### 4.5.- Efecto de la concentración de NaCl en la expresión de la H<sup>+</sup>-PPasa

Los resultados de los niveles de expresión de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi* cultivados en un medio salino conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (4, 8 y 37 ‰), se muestran en la **figura 45**. Los niveles de expresión relativa, cuantificados por RT-qPCR, permanecen sin cambios a concentraciones de 8 y 37 ‰; sin embargo, a concentraciones de 4‰ la expresión se ve significativamente incrementada en relación a los niveles obtenidos para el ciliado cuando está en concentraciones del 37 ‰, que serían seguramente más similares a las de su hábitat natural (**fig. 45**).



**Figura 45.-** Expresión génica relativa de la de la  $H^+$ -PPasa determinada por RT-qPCR en trofozoitos incubados durante 24 horas con un medio conteniendo diferentes concentraciones de NaCl: 4, 8 y 37 ‰. La expresión génica fue normalizada en referencia al gen de la  $\beta$ -tubulina de *P. dicentrarchi* y los datos normalizados se expresan en unidades arbitrarias relativas. Los valores muestran las medias  $\pm$  el error estándar (E.S.) de cinco ensayos. \* $P < 0,01$  es relativo a los ciliados incubados en el medio que contiene una concentración salina de 37 ‰.

## 5.- Modulación del pH intracelular en *P. dicentrarchi* en diferentes condiciones fisiológicas.

### 5.1.-Presencia de calcio en orgánulos ácidos en *P. dicentrarchi*

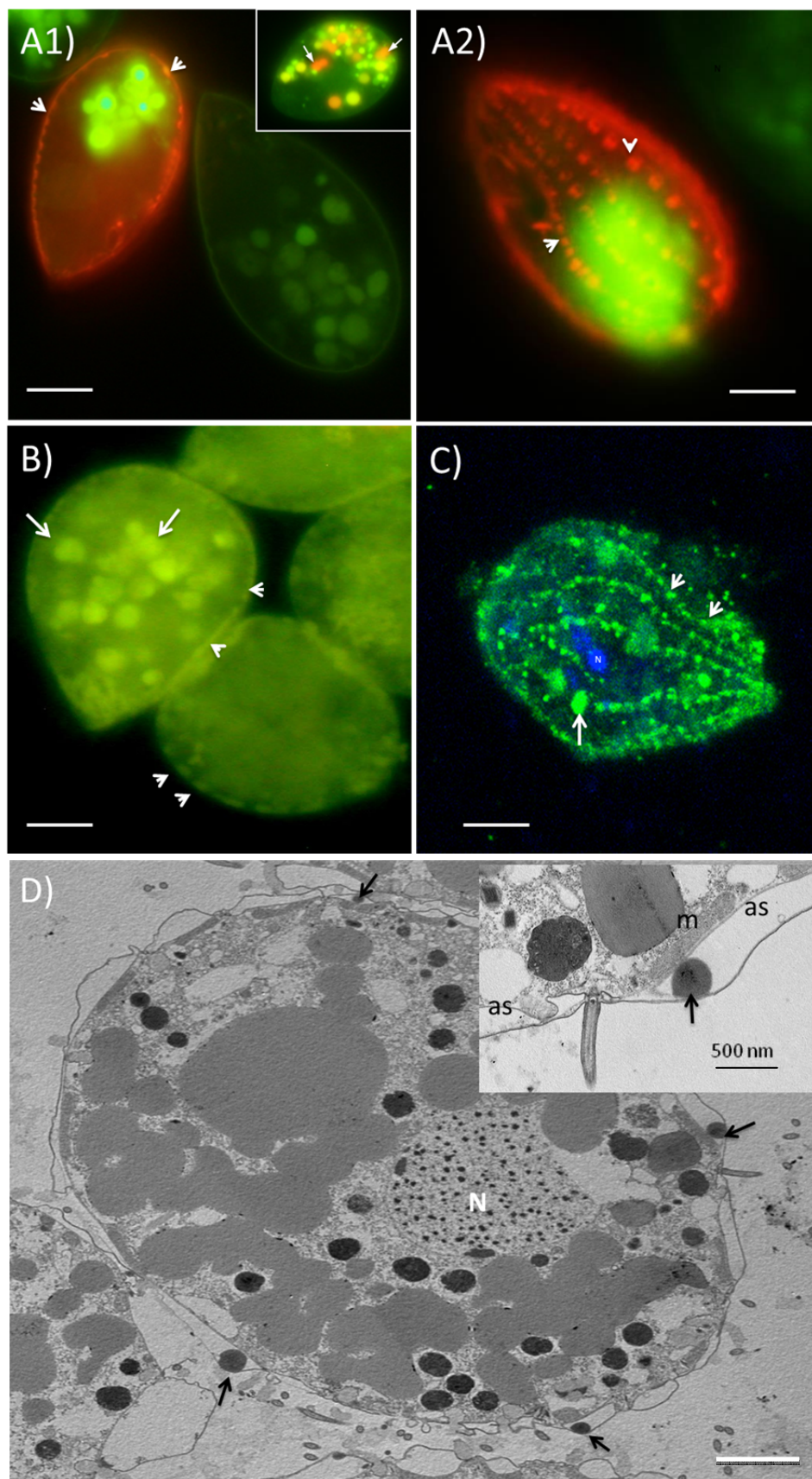
Empleando los colorantes fluorescentes sensibles al pH, naranja de acridina y LysoTracker Red DND-99, (**fig. 46 A1 y A2**) se demuestra la existencia de compartimentos ácidos intracelulares en los trofozoitos de *P. dicentrarchi*. En la parte superior de la primera figura se muestran dos trofozoitos con los sacos alveolares teñidos diferencialmente, uno de rojo intenso (pH ácido) y otro de verde, en el cual los compartimentos estarían menos ácidos. En las preparaciones teñidas solamente con naranja de acridina, se observa la presencia de diferente coloración de las vacuolas citoplasmáticas, indicando su diferente grado de acidificación, pudiendo

además observarse también que la distribución de los sacos alveolares coincide con el patrón de distribución ciliar.

Paralelamente, para estudiar la distribución del calcio en *P. dicentrarchi* se empleó la sonda de calcio Fluo-4 AM. Como se puede observar en la **figura 46 B**, el calcio en el ciliado se localiza principalmente en algunas vacuolas internas y en los sacos alveolares, mostrando un patrón de distribución muy similar a la distribución de la pirofosfatasa (**fig. 46 C**), ya previamente descrita, distribuyéndose en los compartimentos ácidos del ciliado. Además, tal y como puede observarse, la pirofosfatasa localizada en los sacos alveolares aparece con un punteado fluorescente y coinciden perfectamente con la posición y distribución de las cinetias, ratificando su localización en estos compartimentos (**fig. 46 C**).

Por otra parte, en los cortes de microscopía electrónica pueden observarse unos depósitos electrodensos en la zona citosólica y también en algunos sacos alveolares (**fig. 46 D**). Otra de las características observadas a nivel ultraestructural, es la estrecha relación entre la membrana interna de los sacos alveolares, y la mitocondria, situada inmediatamente debajo (**fig. 46 D**).





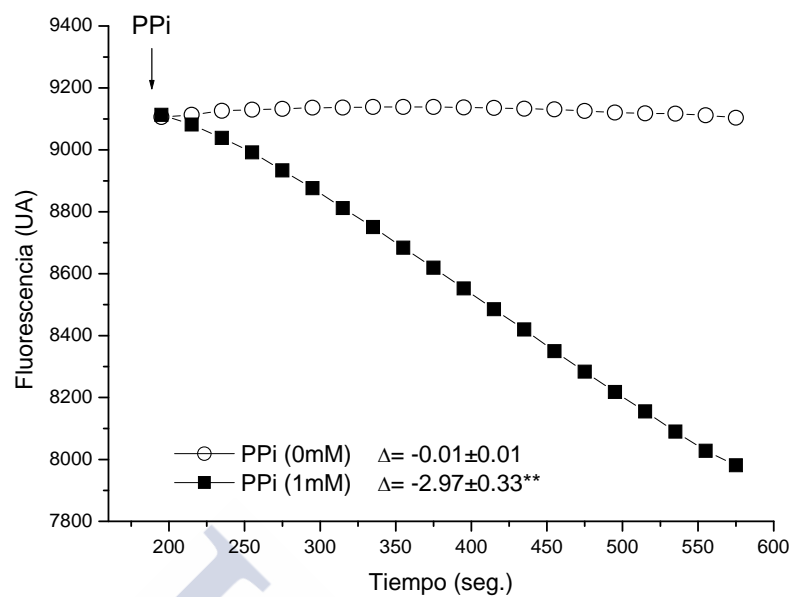
**Figura 46:** Localización y distribución del calcio en compartimentos ácidos en *P. dicentrarchi*. **A1) y A2)** Fotografía de tinción fluorescente con naranja de acridina y Lysotracker Red 99-DND. En la figura **A1** se puede observar una tinción fluorescente intensa de los sacos alveolares teñidos con ambos colorantes (puntas de flecha). En el recuadro situado en la parte superior se muestra una tinción con naranja de acridina solamente tiñendo las vacuolas de diferente color (rojo/naranja/amarillo/verde) según su mayor o menor acidez (flechas). Como puede observarse en las figuras **A2** y **C**, la distribución de los sacos alveolares coincide con el patrón de distribución de las cinetias (puntas de flecha). **B)** La sonda de calcio Fluo 4-AM, muestra los almacenes de calcio distribuidos en los sacos alveolares (puntas de flecha) y vacuolas internas (flechas). **C)** Inmunolocalización de la  $H^+$ -PPasa con el anticuerpo recombinante, que tal y como se ha descrito con anterioridad, marca los sacos alveolares (puntas de flecha) y algunas membranas de vacuolas internas (flechas). **D)** Microfotografía al microscopio electrónico de transmisión (TEM) de un trofozoíto de *P. dicentrarchi*. Visión panorámica de una sección ultrafina mostrando la presencia de sacos alveolares debajo de la membrana plasmática que contienen en su interior un cuerpo esférico electrodensito (flechas). En la esquina superior derecha se muestra el detalle de una zona superficial del trofozoíto donde se observa con mayor precisión la presencia del cuerpo electrodensito (flecha) en el interior de los sacos alveolares (as) y debajo de éstos y en íntimo contacto con la membrana interna de los as, la mitocondria (m). La presencia de cuerpos electrodensitos también se observan en el interior de las vacuolas citoplasmáticas. N = núcleo.

## 5.2.- Efecto del ATP en la actividad translocadora de protones

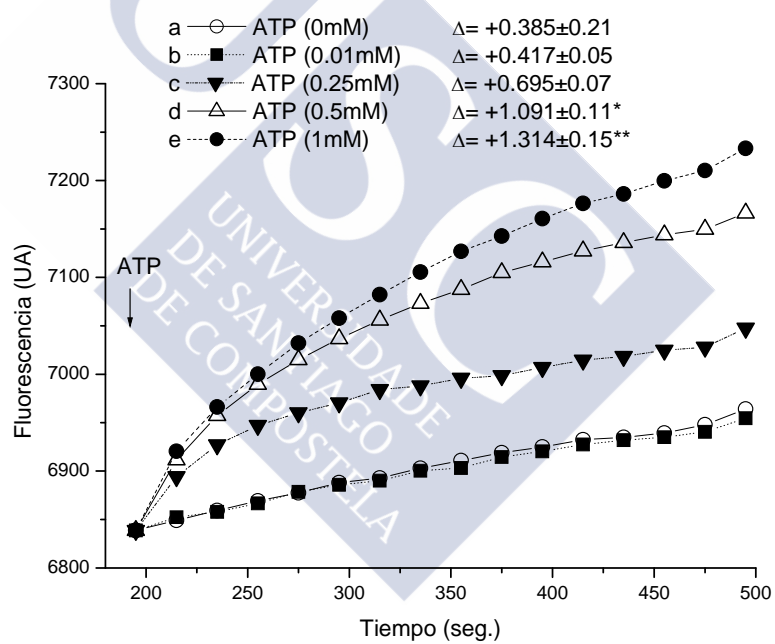
Para estudiar la posibilidad de que parte de la translocación pudiera ser debida a la existencia de una  $H^+$ -ATPasa, se realizó un ensayo de translocación de protones investigando el efecto del ATP sobre esta actividad. Como puede observarse en la **figura 47 B**, el ATP no induce la translocación, a ninguna de las concentraciones empleadas, al contrario de lo que pasa al adicionar PPi (**fig. 47 A**). En muestras a las que se les indujo la translocación de  $H^+$  a través de la adición de PPi, el ATP resultó ser inhibitorio de la actividad a partir de concentraciones de 0.5mM (**fig. 47 C**). Estos resultados no evidencian la existencia de una ATPasa translocadora de  $H^+$  y esta actividad parece estar llevada a cabo, al menos principalmente, por la  $H^+$ -PPasa.

## Resultados

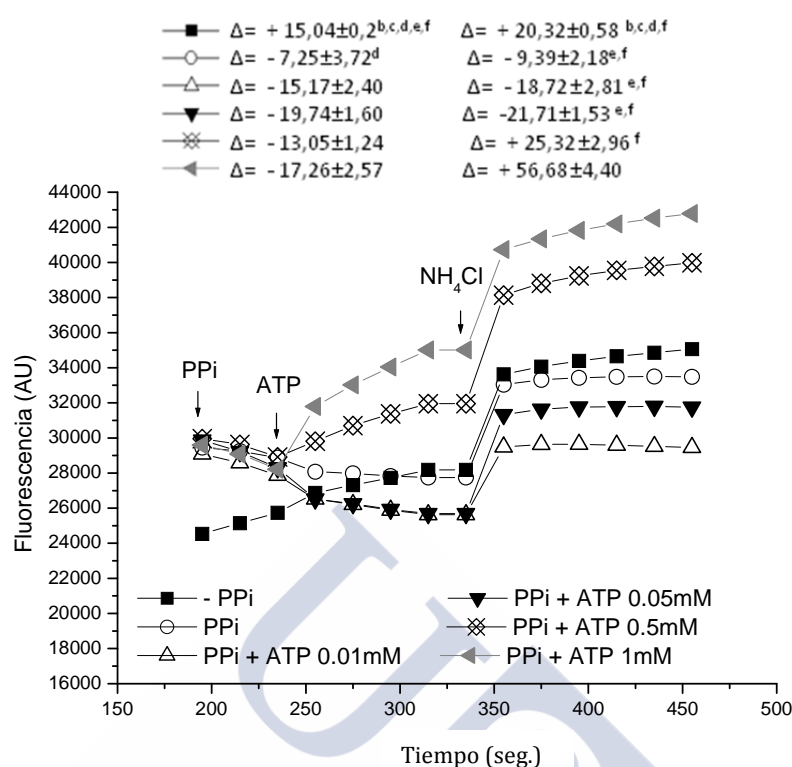
A)



B)



C)



**Figura 47:** A) Ensayo de translocación de  $\text{H}^+$  en presencia y ausencia de PPI. B, D, E: Efecto del ATP sobre la translocación de  $\text{H}^+$  de la  $\text{H}^+$ -PPasa. El ATP inhibe la translocación de  $\text{H}^+$  a partir de una concentración de 0,5 mM. Los valores indican el  $\Delta\text{pH}$ , medido utilizando naranja de acridina, está expresado como la media  $\pm$  error estándar en unidades de fluorescencia arbitrarias por segundo (UA/seg).  $P > 0,05$ ,  $n = 5$ .

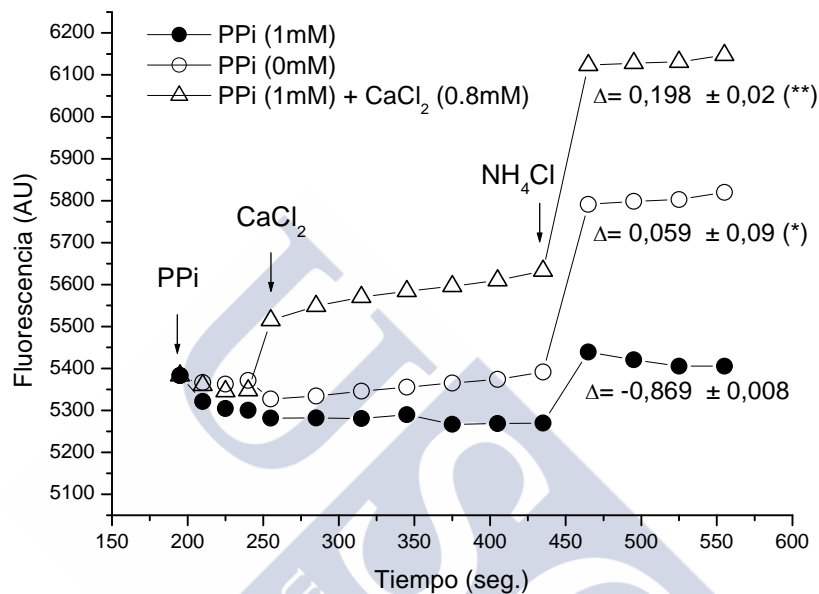
### 5.3.- Efecto del calcio en la actividad translocadora de protones

El calcio es un conocido inhibidor de la  $\text{H}^+$ -PPasa, sin embargo no lo es de la  $\text{H}^+$ -ATPasa; por ello, se estudió su efecto sobre la  $\text{H}^+$ -PPasa y se empleó para estudiar la posible existencia de algún tipo de actividad translocadora llevada a cabo por una  $\text{H}^+$ -ATPasa, que pudiese estar enmascarada por la actividad translocadora de la  $\text{H}^+$ -PPasa. Como puede observarse en la **figura 48**, el calcio produce una inhibición de la actividad translocadora de  $\text{H}^+$  inducida por PPI, a una concentración de 0,8mM (**fig. 48 A**). Cuando se añade calcio para eliminar la posible translocación por la  $\text{H}^+$ -PPasa y después se añade ATP para intentar estimular la translocación de protones a través de una

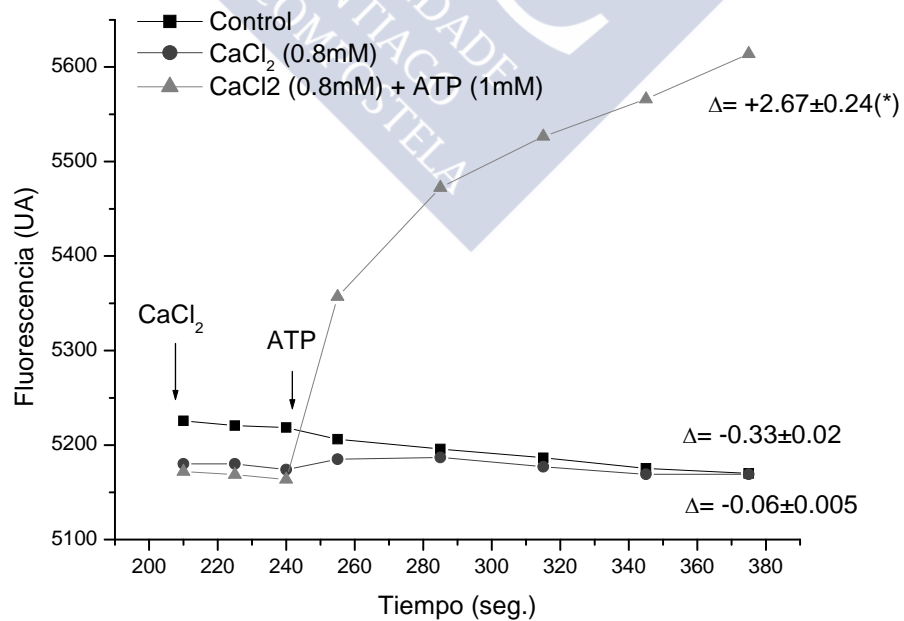
## Resultados

$H^+$ -ATPasa, sucede lo mismo que cuando se añade ATP solamente, se produce una alcalinización del compartimento (**fig. 48 B**). El  $Ca^{+2}$  se adicionó a partir de una solución stock de  $CaCl_2$ , 8mM.

A)



B)

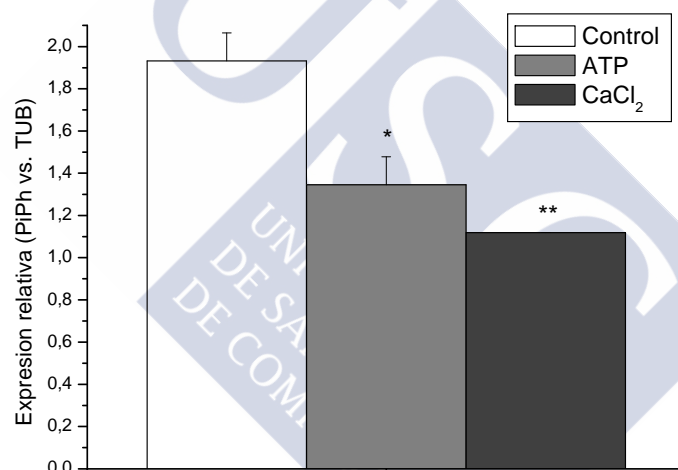


**Figura 48:** A) Efecto del calcio en la translocación de protones resultando inhibitorio de la actividad. B) Efecto del ATP sobre ciliados a los que se le ha bloqueado la translocación llevada

a cabo por la  $H^+$ -PPasa con la adición de calcio. Los valores indican el  $\Delta pH$  medido a través del naranja de acridina hasta el momento de la adición de  $NH_4Cl$ , media  $\pm$  error estándar, en unidades de fluorescencia arbitrarias por segundo (UA/seg). \*  $P > 0,05$ ,  $n = 5$  con respecto a los valores de la muestra a la que se le añade el PPI.

#### 5.4.- Influencia del calcio y el ATP en la expresión génica de la $H^+$ -PPasa

Para estudiar el efecto del calcio y el ATP en la expresión génica de la  $H^+$ -PPasa, los ciliados se trataron durante 24 horas con ATP 1 mM y  $CaCl_2$  0,8 mM, y se analizó la expresión mediante RT-qPCR. Como gen de referencia se usó el gen de la  $\beta$ -tubulina de *P. dicentrarchi*. Como puede observarse en la **figura 49**, el calcio en ambos casos disminuye la expresión del gen.



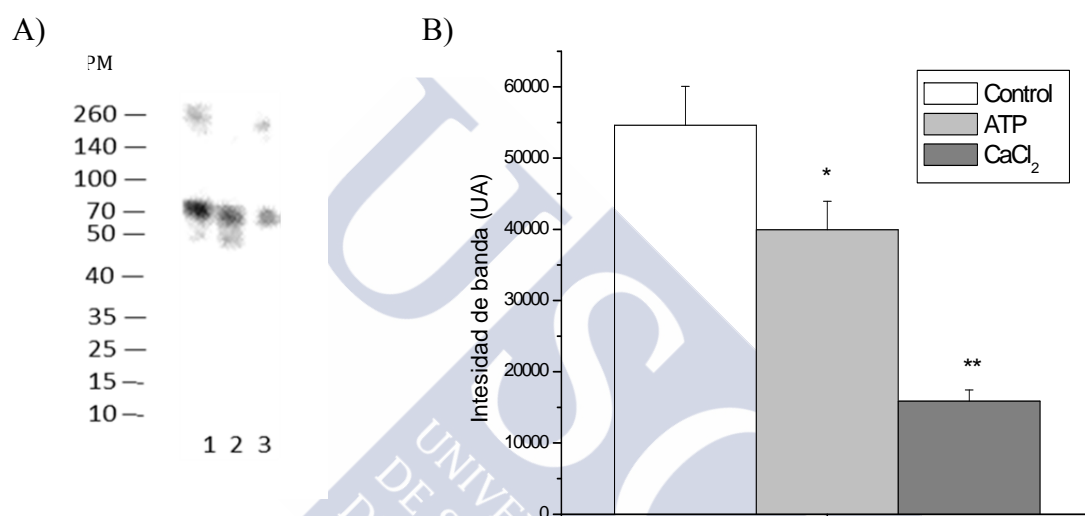
**Figura 49:** Expresión relativa de la  $H^+$ -PPasa en ciliados tratados durante 6 horas con ATP a 1 mM y  $CaCl_2$  a 0,8 mM mediante RT-qPCR. En ambos casos, la expresión del gen de la  $H^+$ -PPasa se vio disminuida. La estadística sobre los datos normalizados con el gen de referencia, la  $\beta$ -tubulina, se realizó sobre los ciliados cultivados sin la adición de ATP o calcio (Control). \*  $P > 0,05$ , \*\* $P > 0,01$ ,  $n = 3$ .

#### 5.5.- Efecto del calcio y el ATP en la expresión proteica de la $H^+$ -PPasa

Se estudió el efecto del calcio y el ATP sobre los niveles de la  $H^+$ -PPasa a través del Western blot. Los diferentes tratamientos se añadieron a ciliados en cultivo durante 24 horas, (ATP 1 mM **fig. 50, 1b**,  $CaCl_2$  0,8 mM



**fig. 50, 1c)**, transcurridas las cuales se procedió a la preparación de extractos enriquecidos en vacuolas de los ciliados. Una vez realizada la inmunotransferencia, se empleó el anticuerpo anti-AVP1 de *A. thaliana* (debido a que este posee un mayor título que el de la  $H^+$ -PPasa recombinante) a una dilución 1:2000, seguido de un secundario, ratón anti-conejo (1:6000) observándose que ambos producen una disminución significativa en la expresión.



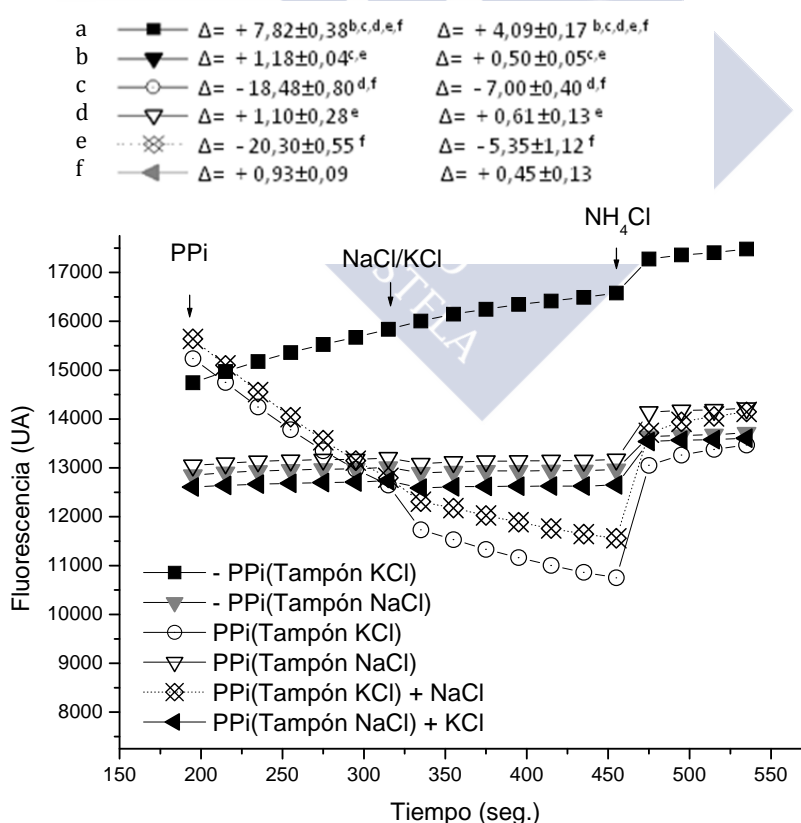
**Figura 50:** Efecto del  $Ca^{+2}$  y el ATP en la expresión proteica de la  $H^+$ -PPasa. **A)** Western blot mostrando el patrón de reconocimiento de extractos proteicos de *P. dicentrarchi* enriquecidos en vacuolas, en condiciones no reductoras (sin DTT) frente al anticuerpo policlonal, anti-AVP 1. Los tratamientos se añadieron a los cultivos de ciliados durante 24 horas (**1**,- Control, **2**,- ATP 1 mM, **3**,-  $Ca_2^+$  0,8 mM). PM: marcador de peso molecular de proteínas. **B)** La intensidad de las bandas (en unidades arbitrarias) se midió con el programa Total Lab y la estadística se realizó en base al control. \*  $P > 0,05$ , \*\* $P > 0,01$ ,  $n = 3$ .

### 5.6.- Efecto de la salinidad sobre la actividad translocadora de protones

Para ver si la salinidad puede afectar a la actividad enzimática del enzima, se realizó un ensayo de actividad translocadora de protones empleando diferentes tampones, en ciliados cultivados en condiciones normales (L-15 suplementado con un 10% de FBS). Los diferentes tampones fueron adicionados en el momento de preparar las muestras; en uno de ellos se



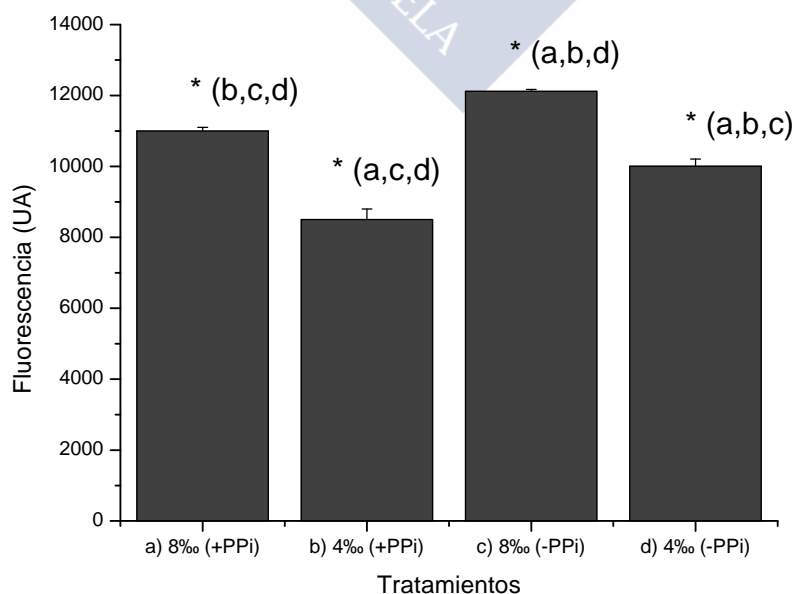
sustituyó el KCl del tampón estándar del ensayo de translocación (100 mM KCl, 0,4 M glicerol, 1 mM Tris-EGTA, and 5 mM Tris-HCL, 1 mM PMSF y 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, pH 8) por esa misma concentración (100 mM) de NaCl, actuando estos como fuente de iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , abundantes en el medio marino. Como puede observarse en la **figura 51** la actividad de bombeo de  $\text{H}^+$  solamente tiene lugar en el caso del empleo del tampón que contiene KCl, resultando el de NaCl inhibitorio de la translocación. Asimismo, se probó a revertir el efecto del tampón con NaCl, adicionándole KCl para intentar inducir la translocación, ya que la  $\text{H}^+$ -PPasa se ha caracterizado como  $\text{K}^+$  dependiente. Sin embargo, la actividad no se ha recuperado tampoco en ese momento. Para el caso contrario, cuando se añadió NaCl a la muestra preparada en el tampón que contenía KCl y que poseía actividad translocadora de  $\text{H}^+$ , éste si resultó inhibir la translocación (**fig. 52**).



**Figura 51:** Efecto del NaCl y KCl en la actividad translocadora de protones de la  $H^+$ -PPasa inducida por PPi. La estadística ha sido realizada con respecto a cada uno de los controles, para cada tramo en la gráfica, después de la adición de PPi, hasta la adición de NaCl o KCl, y desde ese punto hasta la adición de  $NH_4Cl$ . Los valores indican el  $\Delta pH$  medido a través del naranja de acridina, media  $\pm$  error estándar, en unidades de fluorescencia arbitrarias por segundo (UA/seg). Las letras indican  $P > 0.05$ ,  $n = 5$  y con cuál de los tratamientos existen diferencias significativas siendo: a: -PPi (tampón KCl), b: -PPi (tampón NaCl), c: PPi (tampón KCl), d: PPi (tampón NaCl), e: PPi (tampón KCl) y adición de NaCl, f: PPi (tampón NaCl) y adición de KCl.

### 5.7.- Efecto de la salinidad sobre los niveles de calcio intracelular

Dado que el calcio se localiza en los mismos compartimentos que la  $H^+$ -PPasa y que esta está regulada por la salinidad, se analizó el efecto de dos condiciones de salinidad diferentes, 4 y 8 ‰, en las que el gen de la  $H^+$ -PPasa está más expresado, cultivando los ciliados en esas condiciones durante 24 horas. Posteriormente se añadió PPi 1mM y se dejó actuar 30 min. Transcurrido este tiempo, se adicionó la sonda de calcio (Fluo-4 AM) y tras dejarla incubar durante 1 hora, se midió la fluorescencia. Se realizaron 5 réplicas para cada tratamiento. Como puede observarse en la **figura 52**, los niveles de calcio descenden al añadir PPi tanto a una salinidad de 4 como 8 ‰. A su vez, los niveles de calcio son inferiores en las condiciones más hipoosmóticas.



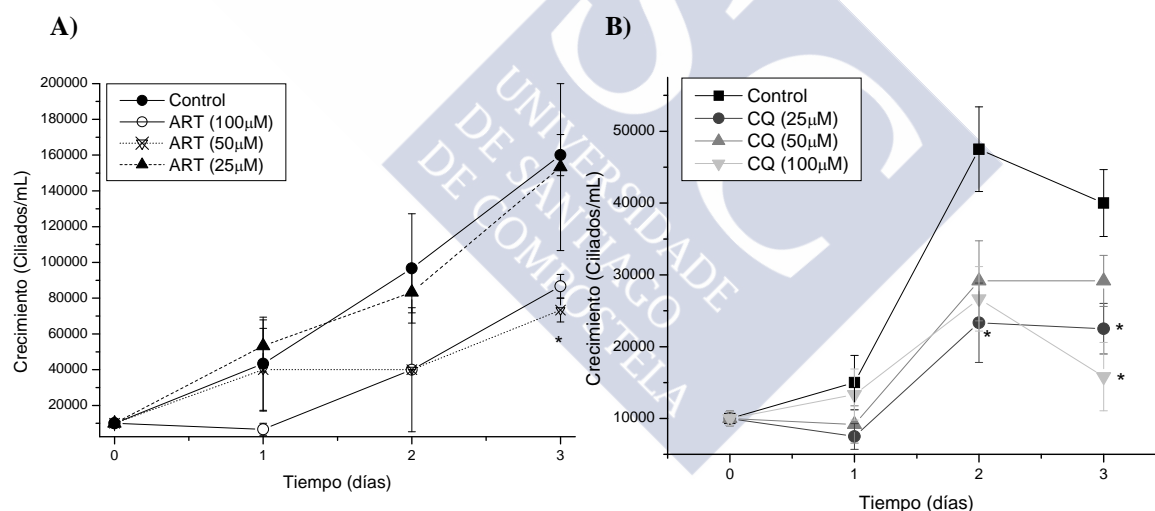
**Figura 53:** Efecto del PPI y la salinidad en los niveles de calcio intracelular. Los resultados muestran los niveles de calcio intracelular medidos con la sonda de calcio Fluo-4 AM. Ciliados crecidos en condiciones de NaCl del 8‰ y 4‰ durante 24h e incubados 1 hora en presencia de PPI y RIS. \* $P > 0.05$ ,  $n = 5$ , con respecto a los grupos correspondientes a y c.

## 6.- Enzimas del metabolismo del pirofosfato y del calcio como agentes quimioterapéuticos frente a la escuticociliatosis

### 6.1.- Antimaláricos

#### 6.1.1.- Efecto de antimaláricos sobre el crecimiento del ciliado

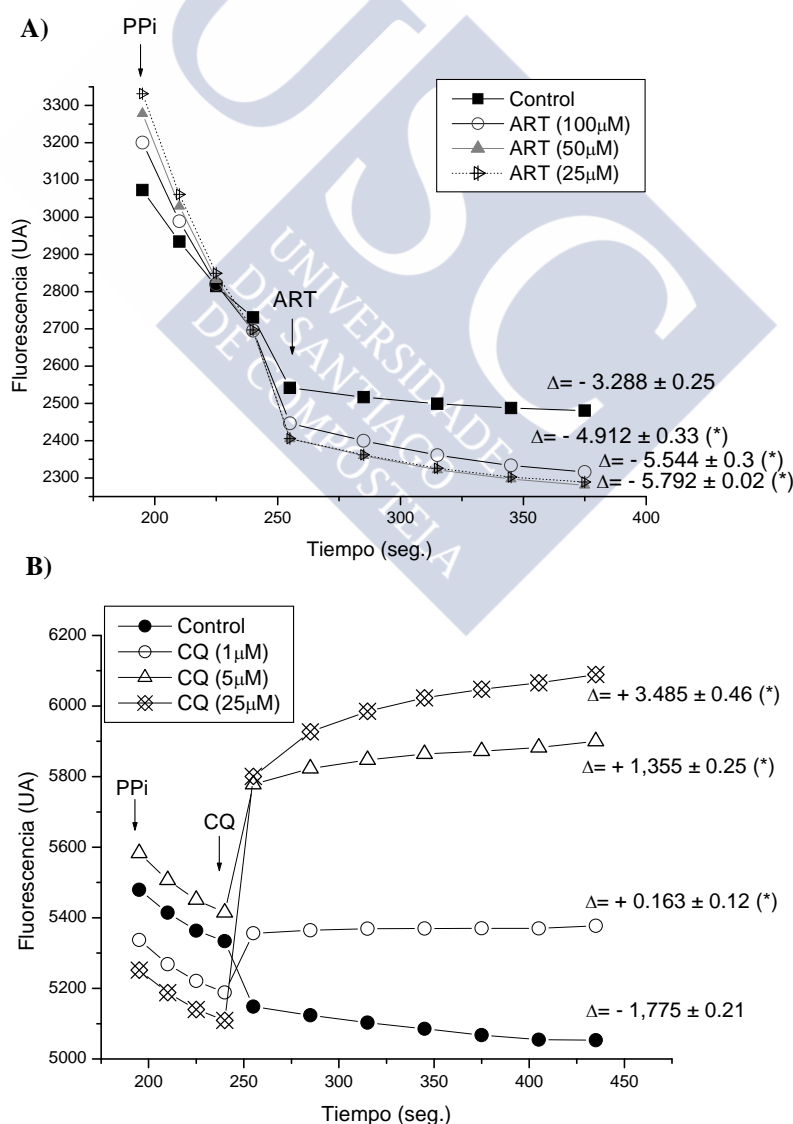
Para ello, los ciliados se cultivaron durante 3 días en L-15 suplementado con un 10% de FBS, con los diferentes tratamientos a varias concentraciones: artemisinina (ART) (**A**), y cloroquina (CQ) (**B**) a 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Las  $\text{IC}_{50}$  a día 3 para cada uno de ellos fueron de: ART 89  $\mu\text{M}$  y CQ 78  $\mu\text{M}$ . Los resultados se muestran en la **figura 54**.

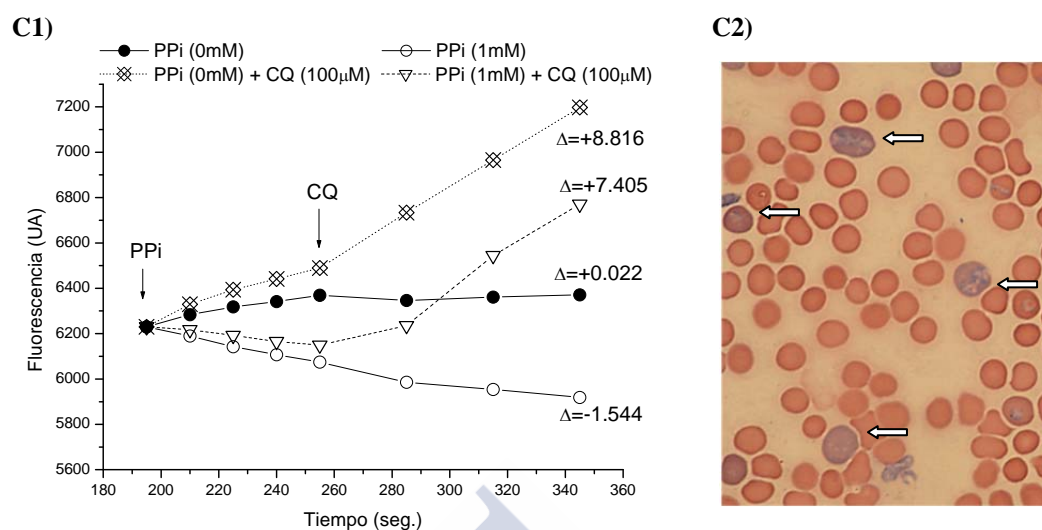


**Figura 54:** Efecto de diferentes antimaláricos (artemisinina (ART) (**A**) y cloroquina (CQ) (**B**), sobre el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi*. Ambos resultaron ser inhibidores del crecimiento. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 5 réplicas. \*  $P < 0.05$

### 6.1.2.- Efecto de los antimaláricos sobre la acidificación celular

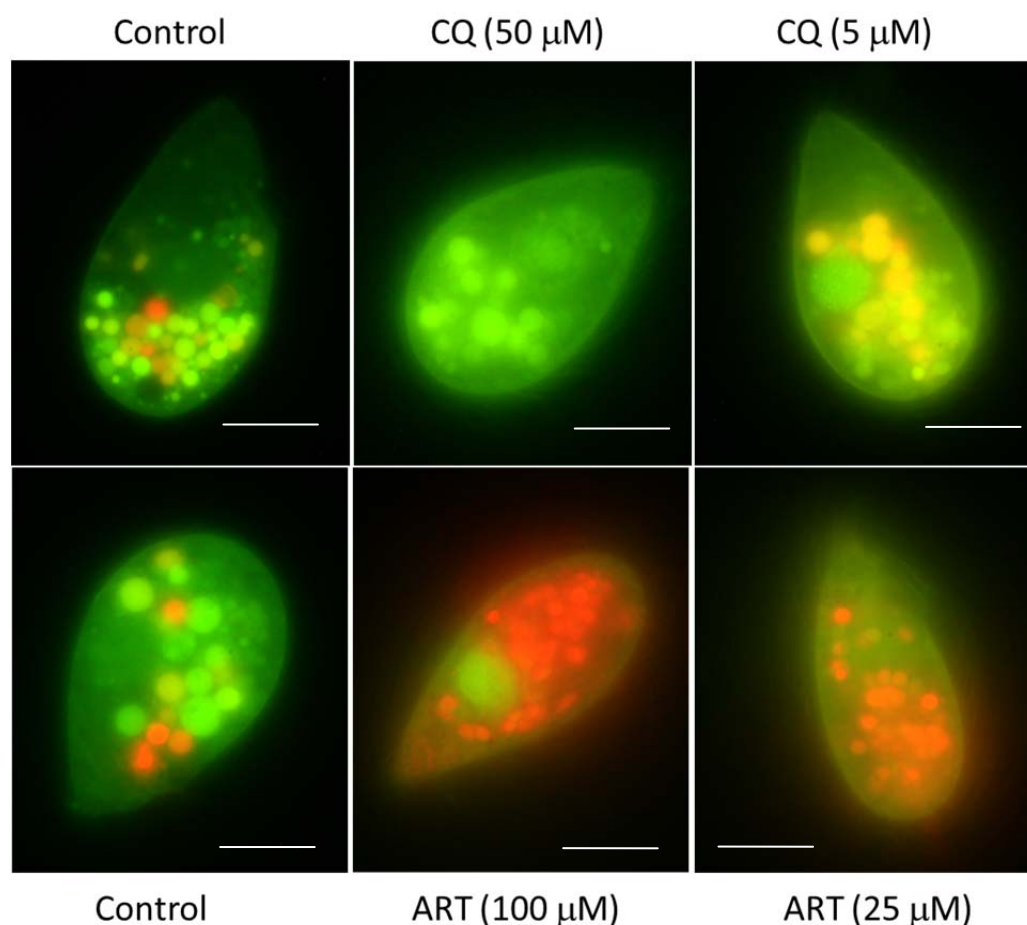
Para ver el efecto de los diferentes antioxidantes estudiados sobre la actividad translocadora de  $H^+$  inducida por pirofosfato, se emplearon los antimaláricos ART (A), y CQ (B) a las dosis que se indican: 25, 50 y 100  $\mu M$ . La CQ ha resultado ser un inhibidor de la translocación dependiente de pirofosfato, bastante efectivo, presentando una  $IC_{50}$  de 13.36  $\mu M$ ; sin embargo, esta actividad, lejos de ser inhibida, se ve incrementada en el caso de la artemisinina. La CQ se probó también frente al modelo murino de la malaria, *Plasmodium berghei*, en el cual, al igual que para el caso del ciliado, provoca alcalinización (C).





**Figura 55:** Actividad translocadora de protones de la  $H^+$ -PPasa con el empleo de diferentes antimaláricos y antioxidantes: ART (A), CQ en *P. dicentrarchi* (B), CQ en *P. berghei* (C1). Los valores indican el  $\Delta pH$  medido a través del naranja de acridina, media  $\pm$  error estándar, en unidades de fluorescencia arbitrarias por segundo (UA/seg). \*  $P > 0,05$ ,  $n = 5$  con respecto a los valores de la muestra a la que se le añade solamente el PPI. En la figura C2 puede observarse una fotografía a microscopio óptico de las células sanguíneas parasitadas con *P. berghei* (flechas).

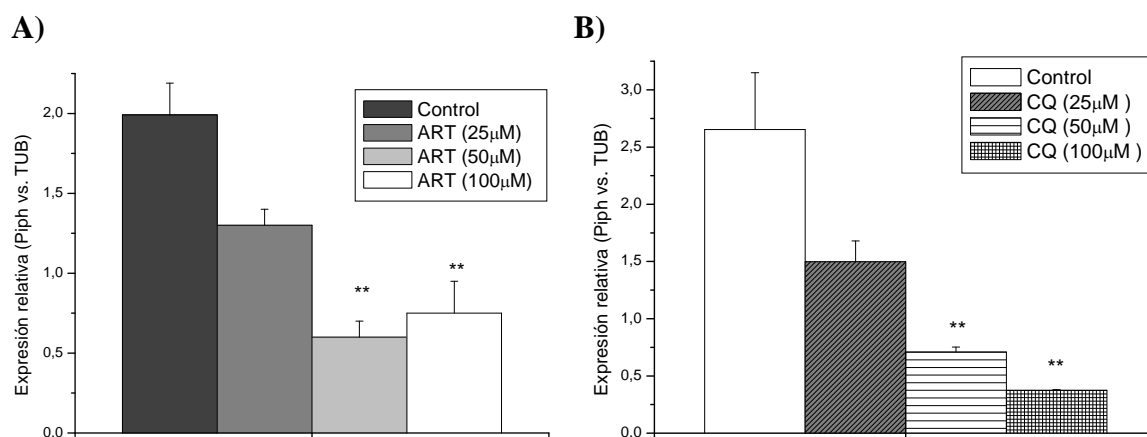
Paralelamente, se realizó un análisis por microscopía de fluorescencia. La tinción con naranja de acridina muestra un patrón divergente entre los ciliados del control y los tratados con los diferentes antimaláricos. Como puede observarse en las microfotografías, y correspondiéndose con los datos obtenidos en el ensayo de translocación de  $H^+$ , la CQ produce una alcalinización de los compartimentos, al contrario de lo que sucede con la ART. Este afecto tiene lugar de modo dosis dependiente (fig. 56).



**Figura 56:** Tinción de compartimentos ácidos con naranja de acridina, de trofozoítos de *P. dicentrarchi* tratados con diferentes dosis de ART y CQ durante 30 min. Como puede observarse, la ART produce una acidificación de las vacuolas con respecto al control sin tratamiento, en el que algunas vacuolas están más ácidas que otras. Sin embargo, la CQ produce una alcalinización, presentando los ciliados tratados menos vacuolas ácidas (rojas) que el control sin tratamiento y una mayor número de vacuolas amarillas/verdes, indicando su alcalinización. Escala = 10μm.

### 6.1.3.- Efecto de los antimaláricos sobre la expresión de la $H^+$ -PPasa

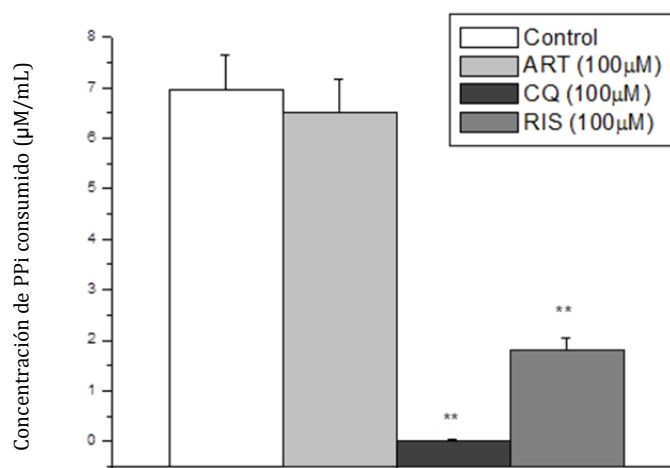
Los ciliados se cultivaron durante 24 horas con varias concentraciones de las diferentes sustancias. Tras la extracción del ARN, se estudió la expresión del gen de la  $H^+$ -PPasa en referencia al gen de la  $\beta$ -tubulina, mediante RT-qPCR. Todos los tratamientos probados bajaron los niveles de expresión génica, a diferentes dosis (**fig. 57**).



**Figura 57:** Niveles de expresión de la  $H^+$ -PPasa con diferentes tratamientos durante 24 horas: A) ART y B) CQ, a las concentraciones indicadas en cada una de las gráficas. Los datos se normalizaron con respecto al gen de la  $\beta$ -tubulina y se presentan en unidades arbitrarias, como la media  $\pm$  error estándar de  $n=5$ . \*  $P=0,05$ . Las  $IC_{50}$  obtenidas fueron de: ART 57.3  $\mu M$ , CQ, 44.34  $\mu M$

#### 6.1.4.- Efecto de los antimaláricos y los bisfosfonatos en los niveles de pirofosfato

Los niveles de PPi en la célula, dependientes de las  $H^+$ -PPasas y sPPasas, entre otras, fueron calculados después de 3 días de tratamiento con los diferentes antimaláricos, CQ y ART, y con el análogo del PPi, el RIS, como control. La CQ y el RIS hicieron disminuir los niveles de PPi consumido mientras que la ART no produjo ninguna variación, indicando que el PPi no ha sido consumido, lo que sugiere que este compuesto no afecta directamente al metabolismo del PPi.

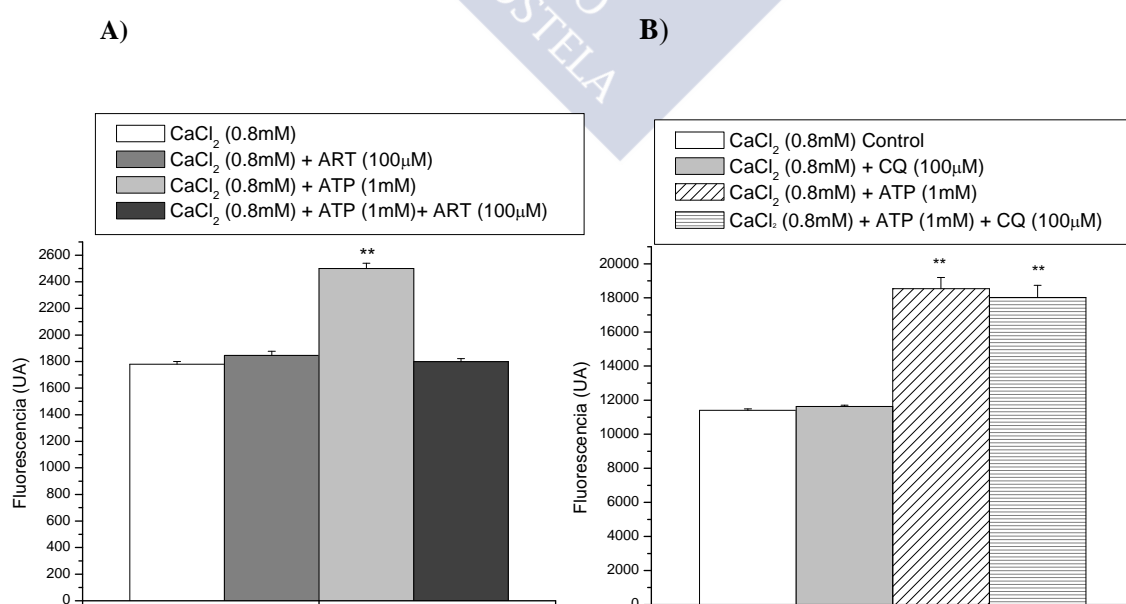




**Figura 58:** Niveles PPi consumido en cultivos de *P. dicentrarchi* tratados durante 3 días con los diferentes tratamientos a las dosis indicadas en la gráfica. La CQ actúa del mismo modo que el inhibidor de la  $H^+$ -PPasa, RIS, haciendo disminuir los niveles de PPi consumido, sin embargo; la ART no parece afectar al metabolismo del PPi al no presentar diferencias en el consumo de PPi con respecto al control.

#### 6.1.5.- Efecto del ATP en la variación de los niveles de calcio intracelular

En base a los datos anteriores que muestran que el calcio modula la actividad enzimática de la  $H^+$ -PPasa, se estudió la posible modulación del calcio intracelular con la adición de ATP, el cual se piensa que podría actuar sobre una enzima dependiente de calcio, la  $Ca^{+2}$ -ATPasa. La ART es un conocido inhibidor de esta enzima. Para estudiar su efecto, se adicionó calcio, se incubaron los ciliados con los diferentes tratamientos durante 1 hora y, posteriormente, se añadió la sonda de calcio (Fluo-4 AM). La fluorescencia se midió 1 hora después de la adición de la sonda. El ATP, sustrato de la enzima, modula los niveles de calcio intracelular, sin embargo con el empleo de la ART, la enzima está bloqueada por lo que no se incrementan estos niveles (**fig. 59 A**). En el caso de la CQ, esta no produce este efecto inhibitorio por lo que no parece que esté afectando a la actividad de la  $Ca^{+2}$ -ATPasa (**fig. 61 B**).

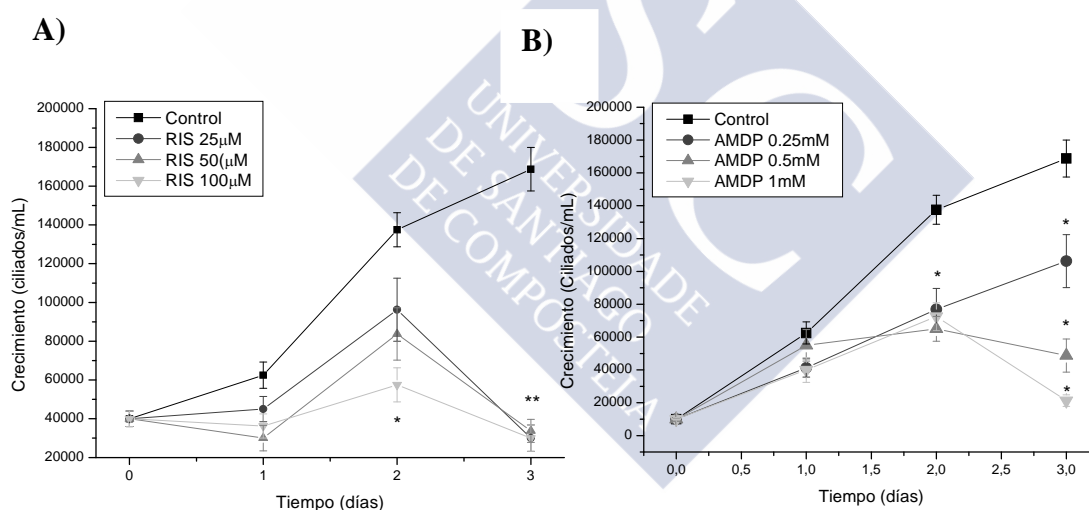


**Figura 59:** Niveles de calcio intracelular. Los ciliados fueron previamente incubados 1 hora con los diferentes tratamientos a las concentraciones indicadas en el gráfico. **A)** Efecto de la ART y **B)** de la CQ. Se estableció como control un cultivo de ciliados al que solo se adicionó calcio y la estadística se realizó en base a este control en cada caso. \*  $P > 0,05$ ,  $n = 5$ .

## 6.2.- Efecto de los bisfosfonatos

### 6.2.1.- Efecto antiparasitario de los bisfosfonatos

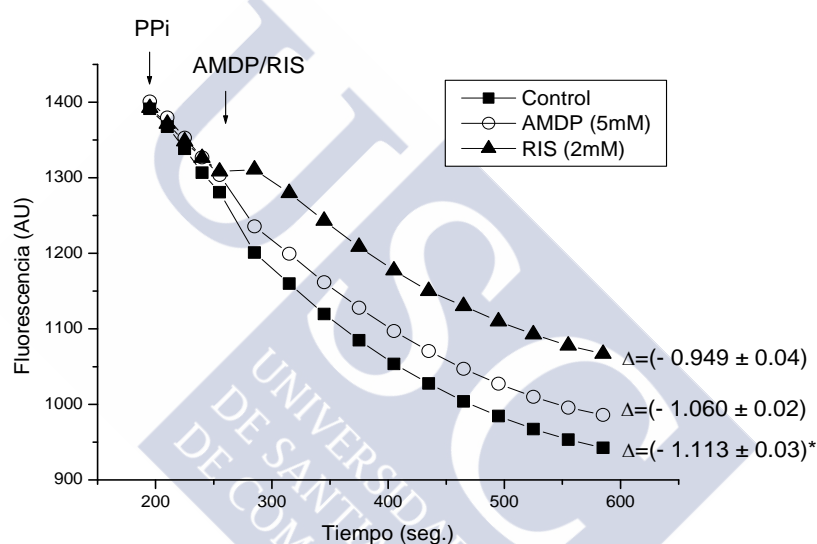
Se estudió el efecto de los bisfosfonatos, análogos del pirofosfato sobre el crecimiento de *P. dicentrarchi* en cultivos *in vitro* y en condiciones de normoxia. El RIS, añadido a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  causó una inhibición significativa del crecimiento del ciliado a partir del segundo día de cultivo (**fig. 60 A**). Sucedió lo mismo para el otro bisfosfonato probado, el AMDP, aunque a muy diferente dosis (**fig. 60 B**); a día 3, la  $\text{IC}_{50}$  del RIS es de 28  $\mu\text{M}$  y la del AMDP es de 0,45 mM.



**Figura 60: A) y B)** Efecto de los bisfosfonatos, RIS y AMDP sobre el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi* en medio L-15 con un 10% de FBS durante 3 días. Los valores que se muestran se corresponden con las medias  $\pm$  error estándar ( $n = 5$  ensayos) del número de trofozoitos/mL \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  con respecto al control sin bisfosfonatos.

### 6.2.2.- Efecto de los bisfosfonatos sobre la actividad translocadora de $H^+$ de la $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi*

Al igual que para el caso del PAM, que inhibe la actividad translocadora de protones de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi*, se realizaron también pruebas de inhibición con otros bisfosfonatos (AMDP y RIS). Los resultados obtenidos muestran que el RIS inhibe parcialmente la actividad translocadora de protones de la  $H^+$ -PPasa (**fig. 61**) mientras que el efecto del AMDP es insignificante.

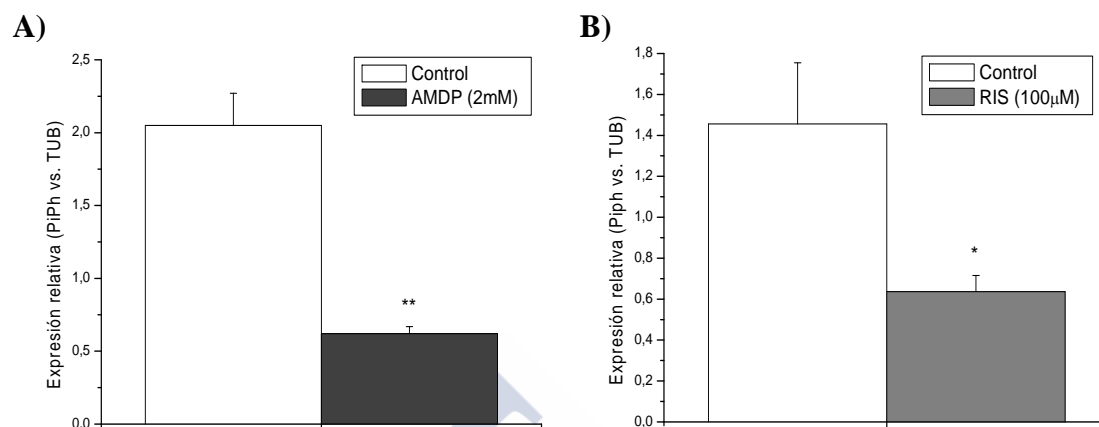


**Figura 61:** Efecto de los bisfosfonatos AMDP y RIS sobre la actividad translocadora de protones de la  $H^+$ -PPasa en una fracción del ciliado enriquecida en vacuolas. El AMDP se empleó a una concentración de 5mM y el RIS a una concentración de 2 mM. Los valores entre paréntesis ( $\Delta pH$ ), indican la capacidad de incremento en la fluorescencia/min  $\pm$  error estándar en unidades arbitrarias de fluorescencia por segundo. \* $P < 0,05$ ,  $n = 5$ .

### 6.2.3.- Efecto de los bisfosfonatos sobre la expresión génica de la $H^+$ -PPasa.

Ambos, el AMDP, a una concentración de 2 mM, y el RIS, a una concentración de 100  $\mu$ M, produjeron una inhibición significativa de la expresión de la  $H^+$ -PPasa con respecto a los controles sin tratamiento (**fig. 62 A y B**). Los ciliados se mantuvieron con los diferentes tratamientos durante 24

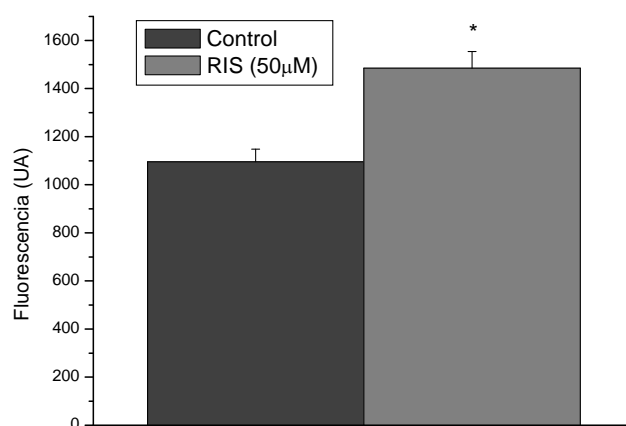
horas en condiciones de normoxia. La expresión del gen de la  $H^+$ -PPasa se midió de forma relativa a la del gen de la  $\beta$ -tubulina.



**Figura 62:** Expresión génica relativa de los niveles de  $H^+$ -PPasa determinados por un ensayo de RT-qPCR en presencia de análogos del PPI como el AMDP (A) y el RIS (B). La expresión génica ha sido normalizada mediante el empleo del gen de referencia  $\beta$ -tubulina de *P. dicentrarchi* y el análisis relativo se realizó mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ . Cada barra vertical representa la media  $\pm$  el error estándar  $n=3$ . \* indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles sin tratar. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  con respecto al control.

#### 6.2.4.- Efecto del RIS, sobre los niveles de calcio intracelular

Para estudiar si los niveles de calcio intracelular están modulados por los análogos del PPI, se empleó el que resultó ser el bisfosfonato efectivo a dosis más bajas en el ciliado, el RIS, añadido como tratamiento a los ciliados durante 1h, tras la cual se añadió la sonda de calcio Fluo 4-AM y se midieron los niveles de calcio intracelular a través de fluorimetría. Como puede observarse en la figura 63, estos niveles resultaron incrementados, justamente lo contrario de lo que se observó, tal y como se ha descrito previamente, con la adición de PPI.



**Figura 63:** Niveles de calcio intracelular empleando la sonda de calcio Fluo 4 AM tras 1h de tratamiento con RIS una concentración de 50  $\mu$ M. Cada barra vertical representa la media  $\pm$  el error estándar  $n=5$ . \* indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo tratado y el control sin tratar. \* $P < 0,05$  con respecto al control.



## *Discusión*

---



Los ciliados se consideran uno de los grupos de protozoos más abundantes y ampliamente extendidos en el medio marino, existiendo más de 800 especies intersticiales, incluyendo alrededor de 60 especies de escuticociliados (Wang y col., 2008). Los escuticociliados generalmente se distribuyen, dentro del biotopo marino, en las áreas costeras, especialmente en aguas eutróficas de maricultura (Song y col., 2009). En cuanto a la distribución de los escuticociliados con relación a la disponibilidad de  $O_2$ , éstos se acumulan habitualmente en las zonas microaerófilas de la oxiclina o del monimolimnion (Miracle y col., 1992) y, aunque pueden crecer rápidamente en la columna de agua o en el bentos, típicamente se encuentran en los sedimentos debido a la existencia de un nicho anóxico (Hayward y col., 2003), comportándose en muchas ocasiones como microaerófilos. En relación a este aspecto, los resultados obtenidos sobre el crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi* bajo condiciones de normoxia e hipoxia, confirman la naturaleza microaerófila de este escuticociliado, el cual presenta una tasa de crecimiento semejante en ambas condiciones.

La existencia de un metabolismo respiratorio microaerófilo en muchas especies de parásitos pone en evidencia su capacidad para adaptarse a diferentes medios, siendo particularmente importante en aquellos en los que existen grandes diferencias de tensión de  $O_2$  entre el hospedador y el ambiente (Harris y col., 2000; Müller y col., 2003; Torrentino-Madamet y col., 2010). Al tratarse la disponibilidad de  $O_2$  de una característica esencial para el desarrollo del metabolismo celular (actuando por una parte como aceptor final de electrones en la respiración mitocondrial y por otra, como origen de especies reactivas de oxígeno -ROS-), la protección frente a la toxicidad por éste, tiene un coste energético, que incrementa a medida que incrementa la tensión de  $O_2$ ; es por ello que algunos protozoos microaerófilos se comportan como anaerobios facultativos creciendo en condiciones de anoxia basadas en un metabolismo fermentativo (Fenchel y Finlay, 2008). Otra hipótesis que se



ha propuesto en diversos organismos para evitar la toxicidad por  $O_2$  es incrementar su consumo cuando este se encuentra en altas concentraciones en el ambiente, empleando una segunda oxidasa alternativa terminal (AOX) en la respiración mitocondrial (McDonald y Vanlerberghe, 2004) cuyo funcionamiento no es inhibido por el KCN (un inhibidor de la citocromo c oxidasa, el complejo IV mitocondrial). En un estudio previo realizado en *P. dicentrarchi* se ponía de manifiesto la capacidad de funcionamiento de su respiración mitocondrial con KCN presente en el medio (Morais y col., 2013), lo que podría ser un indicativo de la posible presencia de una ruta alternativa que implicase la existencia de una AOX en la respiración mitocondrial del escuticociliado. Esta proteína ha sido identificada en muchas especies de plantas, hongos y en algunos protistas, incluidos los ciliados (Young, 1983; McDonald, 2009; Vanlerberghe, 2013) encontrándose, sin embargo, ausente en vertebrados y artrópodos, hospedadores de muchos parásitos, por lo que se ha propuesto en diversas ocasiones como una potencial diana terapéutica (Moore y Albury, 2008; McDonald, 2009). En este estudio, se ha comprobado que el KCN solo inhibe parcialmente la respiración mitocondrial en *P. dicentrarchi*, a una concentración de 100  $\mu M$ ; este fenómeno también ocurre en otras especies de ciliados (Pace y Belda, 1944), algunas de las cuales presentan una AOX, como es el caso de *Tetrahymena pyriformis* (Young, 1983).

La AOX presenta una afinidad por el oxígeno más baja que la citocromo c oxidasa, y esta afinidad parece ser todavía más baja en protozoos que en plantas (Ribas-Carbo y col., 1994). Esta particularidad podría servir para asegurar que la enzima se encuentre más activa a niveles altos de  $O_2$ , con la finalidad de incrementar los niveles de respiración sin generar mayor cantidad de ATP (McDonald y Vanlerberghe, 2004). En protozoos parásitos, la respiración resistente a KCN podría tener un papel importante en el estatus energético de la célula, bajando el rendimiento de la síntesis de ATP y

atenuando la producción de ROS (Jarmuszkiewicz y col., 1998; Czarna y Jarmuszkiewicz, 2005; Chaudhuri y col., 2006; Woyda-Ploszczyca y vol., 2009). La AOX es resistente al KCN y AMA (inhibidor específico del complejo III), e inhibida por los ácidos benzohidroxámicos como el SHAM (Schonbaum y col., 1971; Stoppani y col., 1980), tal y como se ha comprobado para el caso de los protozoos parásitos, *Cryptosporidium parvum* y *Trypanosoma* (Evans y Brown, 1973; Clarkson y col., 1989; Roberts y col., 2004). El SHAM y compuestos relacionados han sido empleados de modo rutinario en numerosas ocasiones y diferentes organismos para documentar la presencia de las rutas de la respiración resistente a KCN (Janes y Wiest, 1982). Por ejemplo: en *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*, el SHAM se muestra efectivo solo cuando se emplea en conjunto con la AMA (Edwards y Lloyd, 1978; Henríquez y col., 2009), bloqueando alrededor de un 30% de respiración mitocondrial resistente a AMA (Czarna y Jarmuszkiewicz, 2005). En el caso de *P. dicentrarchi*, la fracción de consumo de O<sub>2</sub> resistente al KCN es completamente inhibida con la adición del inhibidor específico de la AOX, SHAM, lo cual provee una evidencia directa de la presencia de una cadena de respiración mitocondrial ramificada en el ciliado (Mallo y col., 2013) del mismo modo que ocurre en otros protozoos como *Plasmodium*, *Cryptosporidium* (Murphy y col., 1997; Suzuki y col., 2004; Mogi y Kita, 2010), *Acanthamoeba* (Jarmuszkiewicz y col., 2001b; Henríquez y col., 2009,) y *Trypanosoma* (Clarkson y col., 1989; Chaudhuri y Hill, 1996; Chaudhuri y col., 2006).

Adicionalmente, el SHAM causa una inhibición significativa del crecimiento *in vitro* de *P. dicentrarchi* a concentraciones mayores de 100 µM. Sin embargo, la existencia de una inhibición significativa a día 2 bajo condiciones de normoxia en las que la AOX no está sobreexpresada, sugiere que el SHAM, además de actuar nivel de esta enzima, debe estar actuando frente a otras dianas. Al mismo tiempo, la IC<sub>50</sub> del SHAM es mayor en

condiciones de hipoxia, coincidiendo con una mayor expresión de la AOX en estas condiciones, por lo que se necesita una mayor dosis del compuesto para bloquear a la enzima. El efecto antiparasitario de inhibidores de la AOX ya había sido confirmado en diversos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, como por ejemplo en el caso de *C. parvum* y *Toxoplasma gondii* (Young y col., 1983; Grady y col., 1993; Roberts y col., 2004; Ott y col., 2006; Nakamura y col., 2010), además de su efectividad como potenciadores de la actividad antiparasitaria de otros fármacos (Murphy y Lang-Unnasch, 1999).

En cuanto a su estructura proteica, la AOX de hongos generalmente existe como un monómero y es independiente de la estimulación por ácidos orgánicos, aunque puede estar estimulada por nucleótidos purínicos (Milani y col., 2001; Jarmuszkiewicz y col., 2011); en cambio, la AOX de plantas parece existir en la membrana como un dímero que puede estar unido covalentemente (estado menos activo), o no covalentemente (estado más activo). Sin embargo, la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal anti-AOX generado en el lirio *Sauromatum gutatum* frente a 48 especies diferentes, representando los reinos Eubacteria, Protista, Fungi, Plantae y Animalia (McDonald, 2009), demuestra que existen regiones muy conservadas en esta proteína. De igual modo, la AOX de *P. dicentrarchi*, es reconocida por anticuerpos policlonales generados contra un péptido sintético, derivado de la secuencia consenso C-terminal, completamente conservada, de un motivo de las isoformas 1 y 2 de la AOX de las plantas *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* y *Oryza sativa* (anti-AOX1/2) (Mallo y col., 2013). Este anticuerpo ya predecía una reactividad cruzada con el ciliado *Tetrahymena thermophila*. Empleado frente a extractos de proteína total de *P. dicentrarchi*, preparados bajo condiciones reductoras (con DTT), este anticuerpo reconoce dos bandas de tamaños moleculares aproximados de 70 y 42 kDa. La presencia de esas bandas parece sugerir la existencia de una forma dimérica de la AOX en *P. dicentrarchi*, sin embargo, cuando se testa el

anticuerpo frente a un extracto de proteínas de membrana del ciliado, tratadas y sin tratar con DTT, se revela que la AOX de *P. dicentrarchi* funciona como un monómero asociado a membrana, de aproximadamente 42 kDa, de manera análoga a lo que sucede en *Trypanosoma brucei*, en el cual la AOX aparece en forma de dímero en SDS-PAGE bajo condiciones desnaturalizantes y como un oligómero en estado nativo (Chaudhuri y col., 2006), y en contraste con la AOX de plantas, la cual existe en la membrana como un dímero (Umbach y Siedow, 1993; McDonald, 2009). Asimismo, este hecho también se asemeja a lo que ocurre en *A. castellanii*, en la que se revelaron tres formas monoméricas de 32, 35 y 38 kDa mediante Western blots realizados con anticuerpos monoclonales generados frente a AOXs de plantas; sin embargo, la regulación positiva de la proteína de 35 kDa está relacionada con un incremento en la actividad respiratoria resistente a KCN, sugiriendo que en la AOX de amebas, se encuentra como un monómero (Lambowitz y col., 1989; Jarmuszkiewicz y col., 1997), aunque existe en la membrana como un dímero, siendo las formas inmaduras de en torno a 42 kDa, y las maduras, de 35 kDa (Henríquez y col., 2009).

Todas las investigaciones sugieren que la AOX es una proteína que se encuentra siempre asociada a membrana y las AOXs eucarióticas investigadas hasta la fecha están asociadas con la parte interna de la membrana mitocondrial (Nihei y col. 2003, Suzuki y col., 2004; Kirimura y col., 2006). La presencia de una banda de mayor peso molecular en el Western blot realizado con el extracto proteico total del ciliado frente al anticuerpo anti-AOX1/2 podría sugerir que la AOX fuese sintetizada como un precursor citosólico de 70 kDa. De hecho, al igual que en *A. castellanii*, se ha observado que la AOX de varias especies de plantas y levaduras se sintetiza como una proteína precursora de mayor peso molecular que la proteína madura mitocondrial (Kearns y col., 1992); sin embargo, los resultados en *P. dicentrarchi* no excluyen la posibilidad de que otras proteínas citoplasmáticas

que no presentan reacción cruzada con el anti-AOX1/2, estén asociadas con la AOX (Mallo y col., 2013).

En referencia a su expresión, en algunos microorganismos se ha observado que no expresan la AOX en condiciones normales de crecimiento, o que su nivel de expresión es muy bajo (Minagawa y Yoshimoto, 1987; Yukioka y col., 1998); sin embargo, del mismo modo que sucede con la respiración mitocondrial, la inhibición química de la vía clásica por los inhibidores específicos de la misma, AMA o KCN, puede inducir la síntesis de la AOX (Goyal y Tolbert, 1989; Sakajo y col., 1991; Kirimura y col., 2000; Fang y Beattie, 2003; Brown y Tuffery, 2010), como se ha descrito, por ejemplo, en la levadura *Hansenula anomala* (Sakajo y col., 1997). No obstante, en *P. dicentrarchi*, esto no sucede únicamente con el empleo de inhibidores de la vía clásica de la respiración, sino que la presencia de inhibidores selectivos de la ruta alternativa, como el SHAM, tienen el mismo efecto en la expresión de la AOX, del mismo modo que sucede, como ejemplo, en la planta del tabaco (Roy y col., 2008).

Además, dado que la AOX participa en el sistema de defensa oxidativo cuando los niveles de ROS se ven incrementados así como cuando decrecen las concentraciones tanto de  $O_2$  como de sus reductores en la mitocondria (Popov y col., 1997), su expresión está regulada por la concentración de  $O_2$  (Szala y col., 2003), que varía frecuentemente, con ciclos consecutivos de normoxia e hipoxia causados por la reoxigenación, como resultado de la generación de ROS (Amor y col., 2000). Por otra parte, los endoparásitos que colonizan el hospedador tienen que afrontar variaciones de concentraciones de  $O_2$  en diferentes órganos y, adicionalmente, la propia inflamación que producen promueve el consumo de  $O_2$ , creando un ambiente pobre en  $O_2$  al que los parásitos tienen que adaptarse con rapidez (Dietz y col., 2012). Reflejo de estas adaptaciones es la carencia de citocromos y la respiración exclusiva vía AOX que presentan las formas del torrente sanguíneo de ciertos

endoparásitos como *Trypanosoma brucei* (Walker y col., 2005). Coincidiendo con esta regulación de la AOX por el  $O_2$ , en *P. dicentrarchi* se muestra un claro incremento en la expresión de la enzima en ciliados cultivados *in vitro* bajo condiciones de hipoxia (Mallo y col., 2013), así como en parásitos obtenidos de infecciones experimentales recientes, los cuales procederían también de un ambiente pobre en  $O_2$ .

Bajo condiciones de normoxia, con concentraciones relativamente constantes de  $O_2$  disuelto en el medio de cultivo, *P. dicentrarchi* respira activamente durante la fase logarítmica de crecimiento, indicando que en este estadio se encuentra activa la vía clásica de la respiración mitocondrial; en cambio, cuando los ciliados cesan de dividirse y entran en la fase estacionaria de crecimiento, desciende el consumo de  $O_2$ , sugiriendo que el ciliado entra en un periodo de activación de la vía alternativa de la respiración (Mallo y col., 2013), tal y como puede comprobarse con la inhibición parcial de la respiración ocasionada por la AMA en el día 7 de cultivo, en la que todavía resta un 41% de respiración resistente. La fase de alto consumo de  $O_2$  se correlaciona con la baja expresión de la AOX, mientras que la fase de bajo consumo de  $O_2$  se corresponde con un incremento en la expresión de la AOX (Mallo y col., 2013). Este fenómeno ha sido descrito en otros organismos: las células del hongo *Candida albicans* en fase exponencial de crecimiento, tienen la proporción más baja de actividad insensible al KCN y las células en fase estacionaria tienen la actividad más alta (Brown y Tuffery, 2010). En la fase exponencial de crecimiento, la AOX de *T. cruzi* se inhibe completamente mediante el uso de KCN, pero en la fase estacionaria de crecimiento presenta una insensibilidad de alrededor del 20%, fracción que resulta completamente inhibida por el SHAM (Stoppani y col., 1980). La expresión de la AOX en las células de la ameba de vida libre *Dictyostelium discoideum*, decrece de forma importante entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento (Jarmuszkiewicz y col., 2002), sin embargo, en la cadena respiratoria



mitocondrial de otra ameba de vida libre, *A. castellanii*, la AOX es abundante en la fase exponencial y escasea en la fase estacionaria de crecimiento (Navet y col., 2004).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que *P. dicentrarchi* respira a través de la vía clásica convencional en estadios tempranos de la fase exponencial de crecimiento y en ambientes normóxicos, como se muestra por la inhibición completa del consumo de oxígeno por la AMA. En contraste, en la misma fase de crecimiento y bajo condiciones de poca disponibilidad de O<sub>2</sub>, los ciliados emplean la respiración resistente a AMA (alrededor de un 41%), la cual es completamente inhibida por el PG, un conocido inhibidor de la AOX (Sircar y col., 2012, Cabrera Orefice y col., 2014) (que además induce la expresión de la enzima de un modo dosis dependiente), confirmando la existencia de actividad AOX en *P. dicentrarchi* (Mallo y col., 2014). Este hecho también podría explicar lo que sucede en el escuticociliado marino *Uronema marinum* durante el crecimiento en condiciones normales, donde el metabolismo energético es linealmente proporcional a un grado de crecimiento constante, mientras que el nivel metabólico decrece rápidamente al inicio de la fase estacionaria o en etapas de inanición (Fenchel y Finlay, 1983); esta diferente necesidad o gasto energético se correlacionaría con el empleo de las vías clásica o alternativa de la respiración.

La AOX interviene en el mantenimiento de la homeostasis del O<sub>2</sub> reduciendo la concentración de O<sub>2</sub> libre y disminuyendo la producción de ROS dentro de la mitocondria, sin desregular el estatus energético de la célula (Gupta y col. 2009; Skutnik y Rychter, 2009) y, aunque la disponibilidad de O<sub>2</sub> parece ser un factor importante en la modulación de la respiración por las vías clásica y alternativa, la fase de crecimiento también parece ser significativa en la bioenergética mitocondrial (Czarna y col., 2007; Woyda-Ploszczyca y col., 2011). El impacto del estrés oxidativo en el nivel



bioenergético mitocondrial de *A. castellanii* depende del estado de crecimiento del parásito y del pH (Jarmuszkiewicz y col., 2002; Henríquez y col., 2009; Woyda-Ploszczyca y col., 2011), y está estimulado por los nucleósidos monofosfato GMP, AMP, e IMP (Jarmuszkiewicz y col., 1999; Czarna y Jarmuszkiewicz, 2005). En *D. discoideum*, la capacidad de la respiración decrece cuando la división celular baja, lo que viene acompañado de un decrecimiento en la producción de ROS, cuando las células pasan de fase exponencial a estacionaria (Czarna y col., 2007), o cuando entran en la fase exponencial tardía de crecimiento. Del mismo modo que en estos organismos, la fase de crecimiento, además de la disponibilidad de O<sub>2</sub>, parecen ser los factores clave para la regulación de la AOX en *P. dicentrarchi* (Mallo y col., 2013; 2014).

Con respecto a la regulación de la enzima por el polifenol RESV, en un estudio previo se había detectado que el empleo de este compuesto en ciliados permeabilizados con DIG provocaba la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la reducción en el consumo de O<sub>2</sub> de manera dosis dependiente (Zini y col., 1999; Morais y col., 2013). Los resultados del presente estudio indican que esta fitoalexina es capaz de inhibir ambas rutas de la respiración en el ciliado y que además, también bloquea el consumo de O<sub>2</sub> bajo condiciones de hipoxia, durante la respiración a través de la vía alternativa, indicando que este polifenol podría ser inhibidor de la AOX (Mallo y col., 2014). El RESV también es conocido por inhibir la cadena respiratoria afectando al mecanismo de rotación de la F<sub>1</sub>-ATPasa, por ejemplo en el hongo fitopatogénico *Botrytis cinerea* (Hart, 1981; Sbaghi y col., 1996), el cual posee una AOX (Tamura y col., 1999). Ha sido hipotetizado que la F<sub>1</sub>-ATPasa podría ser una diana para la actividad antifúngica de este compuesto (Caruso y col., 2011).

También existen numerosas referencias concerniendo al efecto antifúngico del compuesto sintético polifenólico PG (Kubo y col., 2001;

Fujita y Kubo, 2002; Hsu y col., 2009), mostrando que los inhibidores de la AOX ejercen una acción preferiblemente fungistática, en lugar de fungicida (Inoue y col., 2012), además de otros muchos estudios que demuestran el efecto antibacteriano del PG en bacterias humanas de la cavidad bucal (Jordan y col., 1961), en las cepas bacterianas intestinales (Chung y col., 1998; Kubo y col., 2002) y en bacterias transmitidas por alimentos (Chung y col., 1993). Sin embargo, el PG no había sido testado hasta el momento como agente antiparasitario y su potencial queda demostrado con el efecto citostático que ejerce, de manera dosis dependiente, en el crecimiento *in vitro* del ciliado parásito *P. dicentrarchi*, observándose una mayor diferencia de crecimiento con respecto al control en el día 3 de cultivo, coincidiendo con un aumento paralelo en la expresión de la AOX (Mallo y col., 2014).

La AMA, un antibiótico que comprende una serie de nueve miembros con anillos dilactona aislados de diferentes cepas de *Streptomyces* (Atta y Ahmad, 2009), también desarrolla actividad antifúngica e inhibición de la actividad enzimática (Shiomi y col., 2005). Del mismo modo que sucede con empleo de PG, también muestra actividad antiparasitaria e inhibe el crecimiento *in vitro* de cultivos del ciliado *P. dicentrarchi* en ambas condiciones, normoxia e hipoxia. En estudios previos (Lamas y col., 2009; Morais y col., 2013), se había descubierto que la AMA y el RESV (ambos inhibidores del complejo III de la ruta clásica mitocondrial), inhibían significativamente el crecimiento del parásito durante la fase exponencial y estacionaria; sin embargo, la inhibición del crecimiento mediada por AMA bajo condiciones de hipoxia, en las cuales la ruta alternativa debería estar operando, parece indicar que la actividad antiparasitaria de este compuesto no es debida exclusivamente al bloqueo de la vía clásica, sino que podría actuar a otro nivel del metabolismo celular del parásito (Mallo y col., 2014). La AMA, el RESV y el PG actúan como potentes activadores de la expresión de la AOX bajo condiciones de normoxia, en las cuales el ciliado respira principalmente

por la vía clásica, aunque la capacidad de activación del PG es menor que la ejercida por los otros dos. En contraste, solamente el PG produce un leve incremento de la expresión de la AOX en condiciones de hipoxia, en las cuales predomina la ruta alternativa, a las dosis empleadas (Mallo y col., 2014).

La inhibición de la vía clásica de la cadena de transporte de electrones (CTE) por AMA o KCN desempeña un papel muy importante en la disminución de la formación de ROS mitocondriales, suministrando una ruta que restringe la vía clásica, previniendo el agotamiento del pool de ubiquinona, que es la mayor fuente de aniones superóxido  $\text{O}_2^-$  (Maxwell y col., 1999; El-Khoury y col., 2013); sin embargo, en investigaciones anteriores se puso de manifiesto que ambos, RESV y AMA, inducen una sobreproducción de los ROS mitocondriales en *P. dicentrarchi* (Morais y col., 2013). Los ROS pueden actuar como sensores y señalizadores intracelulares debido a su sensibilidad a cambios en el estado redox mitocondrial, sirviendo de moduladores de la expresión de la AOX (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Esta enzima se regula positivamente a nivel proteico con la disfunción de los complejos III y IV (Vanlerberghe y McIntosh, 1994; Karpova y col., 2002), sugiriendo que su expresión responde en gran medida a la insuficiente capacidad de la vía clásica precedente al pool de ubiquinona (Vanlerberghe, 2013).

La mitocondria responde constantemente a cambios en la disponibilidad de sustrato y utilización de energía para mantener las reservas de ATP y al mismo tiempo, controlar la producción de ROS. La cadena respiratoria mitocondrial, particularmente los complejos I y III, están considerados el primer origen de ROS, especialmente en condiciones de alto potencial de membrana mitocondrial  $-\Delta\Psi_m$  (de Graaf y col., 2011; Lenaz, 2012), ya que existe una clara regulación positiva entre el  $\Delta\Psi_m$  y el nivel de la formación de ROS (Suski y col., 2012). Uno de los mecanismos que se

sugieren para esta correlación es el que propone que el  $\Delta\Psi_m$  se mantiene a niveles bajos, bajo condiciones normales, previniendo la formación de ROS, pero este mecanismo de mantenimiento y control de esos niveles se bloquea bajo condiciones de estrés y excesivo trabajo, para maximizar la síntesis de ATP (Kadenbach y col., 2013). Por otra parte, el  $\Delta\Psi_m$  es un sistema crítico para el mantenimiento de la función fisiológica de la cadena respiratoria para generar ATP, por lo que una pérdida significativa del  $\Delta\Psi_m$  genera en las células déficits de energía y consecuentemente la muerte celular (Joshi y Bakowska, 2011). Los inhibidores de la CTE podrían interferir en el  $\Delta\Psi_m$ ; tal y como se ha confirmado previamente en *P. dicentrarchi*, con el empleo de RESV (Morais y col., 2013). Los inhibidores de la AOX, como el SHAM, incrementan la producción de ROS mitocondriales en organismos que poseen AOX y este incremento es letal para las células (Mlejnek, 2013). Las variaciones en el  $\Delta\Psi_m$  son uno de los primeros síntomas de inestabilidad o afectación mitocondrial. Se sabe que los compuestos antifúngicos derivados del ácido gálico, como el PG, colapsan el  $\Delta\Psi_m$  en células de levadura que expresan AOX. Se asume que estas disfunciones pueden ser debidas a la acción prooxidante de estos compuestos y que su capacidad antioxidante no estaría actuando en este caso (Sierra-Campos y col., 2009). Los prooxidantes están considerados generalmente percutores de la transición de la permeabilidad mitocondrial, la cual incrementa de forma no selectiva la porosidad de la membrana interna mitocondrial a los solutos de pequeño tamaño, causando un colapso en el  $\Delta\Psi_m$  asociado con la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  (Kushnareva y Sokolove, 2000). En *P. dicentrarchi*, el RESV induce un alto nivel de actividad prooxidante, causando un incremento significativo en el nivel de ROS, acompañado por un colapso mitocondrial debido a la disfunción del  $\Delta\Psi_m$  y un incremento significativo de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Morais y col., 2013), al igual que el PG, el cual también disminuye el  $\Delta\Psi_m$  en el ciliado (Mallo y col., 2014).

La mitocondria sintetiza solamente un pequeño número de proteínas en la matriz: la mayoría de las diferentes proteínas mitocondriales están producidas en los ribosomas citosólicos, y son posteriormente importadas a la mitocondria (Kutik y col., 2007). Las chaperonas localizadas en la mitocondria incluyen a la familia de las Hsp70 (mtHsp70), las cuales residen en la matriz mitocondrial y están codificadas por genes mitocondriales que promueven su correcto plegamiento (Neupert y Herrmann, 2007). La presencia de ROS alterando este sistema, puede afectar negativamente al plegamiento de las proteínas, induciendo la apoptosis celular (Haynes y Ron, 2010), la cual puede ser suprimida por la presencia de mtHsp70, que mantienen el  $\Delta\Psi_m$  mitocondrial e inhiben el incremento de ROS (Qi y col., 2011). La sobreexpresión de las mtHsp70 preserva la función mitocondrial reduciendo el estrés oxidativo y subsecuentemente la apoptosis, a través del bloqueo en la liberación de citocromo c (Mosser y col., 2000; Williamson y col., 2008). Los ROS pueden inducir apoptosis celular y las chaperonas Hsp70 pueden evitar la muerte celular programada, inhibiendo la producción de ROS y manteniendo el  $\Delta\Psi_m$ , por lo que en consecuencia a la bajada del  $\Delta\Psi_m$  experimentado con la adición de PG en el ciliado, sería lógico esperar un aumento de la expresión de chaperonas, para contrarrestar este desequilibrio, hecho que se ha comprobado con el tratamiento *in vitro* con PG en *P. dicentrarchi*. Este compuesto induce, al igual que el RESV, de una forma dosis dependiente, la expresión del gen que codifica para las chaperonas Hsp70, y un incremento en la expresión proteica (Mallo y col., 2014). En el caso del PG, se ha comprobado que estos niveles de expresión proteica se regulan también de un modo dependiente de la dosis. El incremento de la expresión de Hsp70 ha demostrado incrementar la supervivencia celular previniendo la apoptosis durante una amplia variedad de condiciones de estrés, incluyendo el daño oxidativo directo, así como otros tipos de estrés en

los cuales la generación de ROS está implicada en la citotoxicidad o el daño oxidativo de proteínas, ADN y lípidos (Martindale y Holbrook, 2002).

Con estos resultados se demuestra que *P. dicentrarchi* presenta características fisiológicas a nivel del metabolismo mitocondrial que le permiten adaptarse rápidamente a diferentes ambientes con grandes variaciones en la concentración de O<sub>2</sub>. Este escuticociliado posee, además de la citocromo c oxidasa convencional, una segunda oxidasa terminal, permitiéndole obtener energía en ambientes con poca disponibilidad en O<sub>2</sub> y que también podrían servir para protegerlo de las especies reactivas de oxígeno producidas durante la fase activa de la reproducción del ciliado, o de los ROS producidos por las células de sistema inmunitario del hospedador durante la infección. Por tratarse de una proteína que ve inducida su expresión en condiciones de estrés, como las que se producirían durante la fase infectiva (Popov y col., 2001, Costa y col., 2010; Rurek y col., 2015), y no ver modificado su patrón de expresión entre diferentes cepas del ciliado, junto con el hecho de que la AOX no está presente en el hospedador, como sucede en muchos otros parásitos (Ott y col., 2006), esta enzima podría constituir una diana quimioterapéutica prometedora, a pesar de que el hecho del desconocimiento de su secuencia en el gen del ciliado pueda resultar limitante en algunos aspectos. Adicionalmente, el PG, al estar ampliamente extendida su utilización en la industria alimentaria, podría ser de potencial aplicación como tratamiento efectivo frente a la escuticociliatosis.

Otra proteína que es conocida por ver incrementada su expresión en condiciones de estrés e interferir en el metabolismo bioenergético, es la pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones (H<sup>+</sup>-PPasa). Esta enzima es una bomba que transloca H<sup>+</sup> a través de una membrana empleando la energía potencial liberada en la hidrólisis de la unión fosfoanhidro del pirofosfato inorgánico –PPi- (Rea y Poole, 1993). Está distribuida entre casi todas las plantas terrestres pero solamente presente en algunas algas, levaduras,



protozoos, bacterias fototróficas y arqueobacterias (Rea y Poole, 1993; Scott y col., 1998; Rodrigues y col., 1999; Maeshima, 2000; Kajander y col., 2013).

Las  $H^+$ -PPasas nativas están divididas en dos tipos (tipo I y tipo II), en función de su dependencia de  $K^+$  y de su sensibilidad a la inhibición por  $Ca^{+2}$  (Gaxiola y col., 2007; Wang y col., 2013). La mayoría de las  $H^+$ -PPasas independientes de  $K^+$  fueron identificadas en eucariotas, bacterias y arqueas, mientras que las dependientes de  $K^+$  solamente se identificaron en eucariotas (Pérez-Castiñeira y col., 2001a). Las proteínas de todos los miembros de la familia de genes de las  $H^+$ -PPasas de tipo I y II están caracterizadas por la presencia de un bucle de 57 residuos de aminoácidos (aa) que contiene 3 motivos: GGG, DVGADLVGK y DNVGDNVGD que, además de poseer una importancia significativa desde un punto de vista evolutivo, también parece que tienen un significado funcional como parte del centro activo de la enzima (Baltscheffsky y col., 1999; Nakansihi y col., 2001; Drozdowicz y col., 2001; Hedlund y col., 2006; Serrano y col., 2007). En la secuencia de aa de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi*, aparte de esos 3 dominios, también existen otros dos dominios típicos: los motivos EYYT y GNTTAA, los cuales han sido descritos como dominios específicos de la familia de las  $H^+$ -PPasas (Drozdowicz y Rea, 2001; Hedlund y col., 2006) y podrían estar relacionados con la unión al sustrato  $Mg_2$ -PPi, la hidrólisis de PPi y la transferencia de energía (Gaxiola y col., 2007). La secuencia aminoacídica GGG también está presente en todos los miembros de la familia de las  $H^+$ -PPasas y se piensa que provoca un cambio conformacional (Baltscheffsky y col., 1999), aunque también ha sido empleada como espaciador para permitir imitar un movimiento de oscilación en la estructura (Suzuki y col., 1998). Se ha propuesto la configuración (E/D)(X<sub>7</sub>)KXE como sitio catalítico de las  $H^+$ -PPasas (Rea y col., 1992b; Rea y Poole 1993), la que se correspondería con la secuencia DVGADLVGKVE, en *P. dicentrarchi* está localizada en el bucle hidrofílico de la zona carboxiterminal. Además, se ha propuesto que este



motivo podría participar directamente en la unión al sustrato,  $Mg^{+2}$  (Rea y Poole, 1993; Cooperman y col., 1992; Takasu y col., 1997; Baykov y col., 1999).

El segundo motivo, DVGADLVGK y el tercero, DNVGDNVGD podrían estar implicados en la hidrólisis de  $Mg^{+2}$  o  $Ca^{+2}$  y/o la unión al sustrato ( $Mg^{+2}$ ,  $K^{+}$ ) (Rea y col., 1992b; Hedlund y col., 2006). EYYT es un dominio altamente conservado en plantas superiores y posee un papel relevante en el acoplamiento de la hidrólisis del PPI. Este dominio podría estar relacionado con la translocación de  $H^{+}$  y la actividad de las  $H^{+}$ -PPasas en las vacuolas de plantas (Drozdowicz y Rea, 2001). En todas las  $H^{+}$ -PPasas existe un dominio muy conservado, GNTTAA, el cual se considera que podría estar relacionado con la dependencia al  $K^{+}$  (Wang y col., 2013). Este dominio también está considerado como un marcador del tipo de PPasa, I o II. De acuerdo con el primer sitio A (Serrano y col., 2007), éste puede presentarse de dos formas, la forma A que es dependiente de  $K^{+}$  y la forma K, que es independiente de  $K^{+}$  (Belogurov y Lahti, 2002; Hirono y col., 2005; Serrano y col., 2007). La secuencia de la  $H^{+}$ -PPasa de *P. dicentrarchi* presenta el dominio GNTTAA indicando que el ciliado posee una  $H^{+}$ -PPasa de tipo I, dependiente de  $K^{+}$ . La dependencia de la actividad  $H^{+}$ -PPasa de los iones  $K^{+}$  se ha sugerido como de posible vía para un transporte de iones  $K^{+}$  a nivel de las vacuolas, mediado por V- $H^{+}$ -PPasas (Baltscheffsky y col., 1999). Las PPasas más definidas molecularmente carecen del péptido señal N-terminal, excepto las de *Trypanosoma* (Hill y col., 2000) y *Toxoplasma* (Drozdowicz y col., 2003). No se conoce exactamente la función de su secuencia, aunque en el caso de la V- $H^{+}$ -PPasa de *T. gondii*, la presencia de una secuencia putativa (ha sido denominada antes de ser identificada) líder amino terminal, sugiere que esta proteína está procesada en el retículo endoplasmático y que se transporta posteriormente a otra localización en la ruta secretora (Hill y col., 2000; Drozdowicz y col., 2003). Al igual que en el caso de *T. cruzi* y *T.*

*gondii*, *P. dicentrarchi* presenta un residuo N-terminal de 15 aminoácidos. Adicionalmente al péptido señal, la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* también parece tener una diana para un péptido mitocondrial de 30 residuos en el extremo aminoterminal, coincidiendo con la mayoría de las señales peptídicas mitocondriales, localizadas en el extremo N-terminal de la cadena de aminoácidos que se va generando (Emanuelsson et al., 2001). La presencia de dianas peptídicas mitocondriales en la secuencia de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* podría ser debida a un mal diseño en el algoritmo de simulación utilizado por el programa bioinformático, ya que se conoce el hecho de que muchas dianas peptídicas muestran similitudes destacables con las dianas peptídicas mitocondriales en la posición N-terminal (Staiger y col., 2009).

La mayoría de las descripciones estructurales de las  $H^+$ -PPasas derivan de dos prototipos: la  $H^+$ -PPasa vacuolar (V- $H^+$ -PPasa) de plantas y la  $H^+$ -PPi sintasa de la bacteria fototrófica *Rhodospirillum rubrum* (Rea y col., 1992a; Rea y Poole, 1993; Zhen y col., 1997). Las V- $H^+$ -PPasas son proteínas de membrana politópicas, muy homogéneas, compuestas por un único polipéptido que posee rangos de tamaños comprendidos entre 70 a 115 kDa (estimado) y 56-79 kDa (aparente) y están conformadas por 14-17 dominios de hélices  $\alpha$  transmembrana (Rea y col., 1992a; Drozdowicz y Rea, 2001; McIntosh y Vaidya, 2002).

Las variaciones existentes entre el peso molecular del ADNc y el peso molecular aparente del análisis Las por SDS-PAGE es un fenómeno bastante conocido entre proteínas altamente hidrofóbicas como es el caso de las V- $H^+$ -PPasas (Maddy, 1976; Zhen y col., 1997). Mediante el empleo de un anticuerpo específico generado frente al péptido conservado de la V- $H^+$ -PPasa, HKAAVIGDTIGDPLK, llamado PAB<sub>HK</sub>, se ha reconocido en Western blot una V- $H^+$ -PPasa de la arquea *Pyrobaculum aerophilum* clonada en *Saccharomyces cerevisiae* con un tamaño de 64-kDa (Drozdowicz y col., 1999), del mismo modo, este anticuerpo ha mostrado reactividad frente a la V-

H<sup>+</sup>-PPasa en *P. falciparum*, *T. gondii*, *T. cruzi* y *L. donovani* (Drozdowicz y Rea, 2001). En la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi*, el peso molecular estimado a partir de la secuencia de ADNc se encuentra alrededor de los 62 kDa lo cual coincide, a grandes rasgos, con el peso aparente obtenido por Western-blot con extractos proteicos de membrana del ciliado frente a los anticuerpos policlonales producidos por inmunización con ADN y con una proteína recombinante con una secuencia parcial que contiene el motivo HKAAVIGDTIGDPLK (Mallo y col., 2015), la cual supone un motivo altamente conservado entre las V-H<sup>+</sup>-PPasas y ha sido usada para la producción de anticuerpo policlonales en la detección de V-H<sup>+</sup>-PPasas (Kim y col., 1994; Zhen y col., 1997). La predicción topológica de la secuencia de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi* muestra la presencia de 11 regiones de hélices transmembrana, localizadas en los dominios característicos conservados de las V-H<sup>+</sup>-PPasas en el primer bucle citosólico (Mallo y col., 2015).

En bacterias y arqueas se ha descrito un subtipo de PPasas relacionadas de forma distante con las H<sup>+</sup>-PPasas de membrana, con solo un 23-34% de identidad de secuencia; sin embargo, a pesar de esta divergencia evolutiva, estas proteínas mantienen conservados los residuos que interactúan con el sustrato de las PPasas de membrana canónicas así como la lisina específica que confiere la independencia al K<sup>+</sup>. Estas proteínas presentan sin embargo características únicas como su inhibición por Na<sup>+</sup> (Luoto y col., 2015).

La secuencia de aa de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P. dicentrarchi*, así como las secuencias de las H<sup>+</sup>-PPasas de otros ciliados como *T. thermophila*, *I. multifiliis* y *P. tetraurelia*, disponibles en las bases de datos públicas, se corresponden básicamente con la V-H<sup>+</sup>-PPasa tipo I prototípica, la AVP1 de *A. thaliana*; además la H<sup>+</sup>-PPasa contiene la mayoría de los motivos de secuencia característicos de esta categoría de bombas (Drozdowicz y Rea, 2001). Asimismo, han sido identificados dos fragmentos de ADN con secuencias diferentes en *P. tetraurelia* y *T. pyriformis*, indicando la existencia

de 2 genes de la  $H^+$ -PPasa parálogos, en estos organismos (Pérez-Castiñeira y col., 2002b). A través de la comparación de secuencias aminoacídicas en las bases de datos, se deduce que la secuencia de aa de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* es muy similar a la  $H^+$ -PPasa de ciliados y moderadamente similar a la  $H^+$ -PPasa homóloga de plantas. Los genes de la  $H^+$ -PPasa de plantas también se han encontrado en los protozoos de vida libre como los ciliados euglenoides heterotróficos o heterocontes (Pérez-Castiñeira y col., 2002b).

La caracterización molecular y bioquímica de la AVP2, una secuencia divergente de la V- $H^+$ -PPasa en el organismo modelo de plantas *Arabidopsis thaliana*, provee la primera indicación de que las V- $H^+$ -PPasas de un mismo organismo pueden pertenecer a dos categorías diferentes (Drozdowicz y col., 2000). Este fenómeno, además de en plantas, puede ocurrir también en las V- $H^+$ -PPasas de protozoos parásitos como, por ejemplo, *Plasmodium* (McIntosh y col., 2001; Venter y col., 2006). Las AVP1 de plantas comparten entre ellas una identidad de secuencia del 84%, mientras que la AVP2 tan solo un 36% (Drozdowicz, y col., 2000). Las AVP1 dependen de  $K^+$  citosólico para su actividad y son moderadamente sensibles a la inhibición por  $Ca^{+2}$ , mientras que las AVP2, son independientes de  $K^+$  pero extremadamente sensibles a  $Ca^{+2}$  (Sarafian y col., 1992; Drozdowicz y col., 2000; Gaxiola y col., 2007). En parásitos, como en el de la malaria, *Plasmodium falciparum*, también se han descrito dos genes que codifican para la VP1 y VP2 (McIntosh y col., 2001), y en ciliados también existe información correspondiente a dos isoformas en las bases de datos en el himenostomátido *Tetrahymena pyriformis* (número de acceso en el GenBank, AJ251471). Existe una conservación casi completa ente los aminoácidos de las secuencias AVP1/AVP2 reconocidas por el anticuerpo policlonal frente a la secuencia HKA AVIGDTIGPLK ( $PAB_{HK}$ ) que proveen suficiente justificación para la propuesta de este anticuerpo como reactivo universal para la detección de los

polipéptidos de las V-H<sup>+</sup>-PPasas (Drozdowicz y Rea, 2001). En la secuencia de la H<sup>+</sup>-PPasa, se ha observado la presencia de este motivo conservado (Mallo y col., 2015) y mediante análisis por PCR y secuenciación, los resultados muestran que este motivo está codificado por un gen que contiene una secuencia nucleotídica intercalada, que al ser transcrita a ARN, genera 2 isoformas, una de las cuales produce una proteína con este motivo conservado, fragmentado. La otra isoforma produce una proteína que contiene el motivo completo e intacto. Los tamaños completos de las dos proteínas generadas por las dos isoformas varían entre ellas en 2 kDa, correspondientes al tamaño del péptido intercalado en el motivo del PAB<sub>HK</sub>, sin embargo, esta diferencia de tamaño es demasiado pequeña para ser detectada en el análisis mediante Western blot, debido a las limitaciones de la técnica (Daully y col., 2006). Mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en TEM, se ha podido visualizar que el patrón de reconocimiento de un suero generado frente a un péptido formado por la secuencia HKAAVIGDTIGPLK, genera un marcaje específico en la membrana de los sacos alveolares del ciliado, lo que sugiere que este dominio no se encuentra o no es reconocido en la H<sup>+</sup>-PPasa presente en las membranas vacuolares, lo que podría ser una evidencia de la existencia de dos isoformas de la H<sup>+</sup>-PPasa en *P.dicentrarchi*. La hipótesis que se propone para explicar la existencia de dos isoformas de la H<sup>+</sup>-PPasa en el ciliado se basa, por una parte, en el diferente patrón de reconocimiento por los anticuerpos empleados y, por otra parte, en la presencia de dos secuencias aminoacídicas generadas por la misma pareja de cebadores F/R Piph, mediante RT-PCR a partir de ADNc. Aunque la localización subcelular de los miembros de la familia de las H<sup>+</sup>-PPasas está principalmente en las membranas endocelulares (tonoplasto vacuolar), las membranas de los acidocalcisomas de eucariotas (algas, plantas y protozoos) (Maeshima, 2000; Drozdowicz y Rea, 2001; Docampo y col., 2005) y las invaginaciones de la membrana plasmática de bacterias y arqueas

(Baltscheffsky y col., 1999; Serrano y col., 2004), la diferente localización subcelular de las isoformas, AVP1 (vacuola) y AVP2 (complejo de Golgi y lisosomas), solamente ha sido descrita en plantas (Rea y col., 1992a; Mitsuda y col., 2001). En otros organismos como *P. falciparum*, a través de microscopía por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales, se ha investigado la localización subcelular de las V-H<sup>+</sup>-PPasas, indicando que la isoforma VP1 parece estar presente en ambas localizaciones: membrana vacuolar y vacuolas digestivas (Luo y col., 1999; McIntosh y col., 2001; Saliba y col., 2003). En *P. dicentrarchi* la presencia de estas dos isoformas de la H<sup>+</sup>-PPasa, conteniendo ambas el motivo HKAAVIGDTIGPLK, y ambas presentes en la membrana de los sacos alveolares, podría ser debida a la existencia de un proceso de corte y empalme (*splicing*) alternativo, proceso que no afectaría a la isoforma 1, presente en la membrana vacuolar, y generaría una proteína con un motivo fragmentado que no podría ser reconocido por el PAB<sub>HK</sub>. Existen diversos ejemplos de genes que generan isoformas transcritas por un promotor alternativo el cual puede intervenir en la señalización celular e inducir su translocación a diferentes localizaciones subcelulares (Saitoh y col., 2002). Adicionalmente, se sabe que la regulación del *splicing* puede estar modulada por diferentes elementos de secuencia en ambos, exones e intrones, que pueden activarlo o silenciarlo (Poulos y col., 2011).

Por otra parte, la descripción de las secuencias nucleotídicas de los genes de las H<sup>+</sup>-PPasas en plantas, bacterias y arqueas, muestran un alto grado de conservación (Serrano y col., 2007), al igual que sucede en los diferentes aislados de *P. dicentrarchi* (Budiño y col., 2011), lo que demuestra la idoneidad del empleo de este gen, en conjunto con otros genes conservados como la  $\beta$ -tubulina, en el estudio de la detección de variaciones genéticas intraespecíficas en poblaciones de escuticociliados que infecten al rodaballo en cultivo.



Respecto a la localización de las V-H<sup>+</sup>-PPasas, en plantas están presentes en la membrana vacuolar (tonoplasto) y también en la membrana plasmática y el aparato de Golgi (Rea y Poole, 1993; Long y col., 1995; Robinson y col., 1996); sin embargo, en otros organismos, las V-H<sup>+</sup>-PPasas pueden estar localizadas en otros orgánulos, como los acidocalcisomas de tripanosomátidos y apicomplejos, y en las membranas plasmáticas del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, la ameba *Dictyostelium discoideum* y las bacterias *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodospirillum rubrum* y *Syntrophus gentianae*, (Schöcke y Schink, 1998; Rodrigues y col., 1999b; Luo y col., 1999; Docampo y Moreno, 2001a; Martínez y col., 2002; Miranda y col., 2004; Seufferheld y col., 2004; Sen y col., 2009). Los acidocalcisomas son orgánulos subcelulares ricos en Ca<sup>+2</sup> y PPi, característicos de Trypanosomatidea y Apicomplexa, que comparten propiedades con las vacuolas de plantas y presentan en sus membranas una V-H<sup>+</sup>-PPasa, además de otras bombas (Hannaert y col., 2003). Se trata de orgánulos ácidos de reserva de Ca<sup>+2</sup>, caracterizados por su alta electrodensidad y su alto contenido en polifosfatos, calcio, magnesio, sodio y zinc (Docampo y Moreno, 1999). A través de los análisis inmunohistoquímicos llevados a cabo en *P. dicentrarchi*, se revela que en este caso, la H<sup>+</sup>-PPasa, al igual que ocurre en otros protozoos, está principalmente localizada en la membrana de las vacuolas y los sacos alveolares del parásito (Mallo y col., 2015).

En cuanto a la regulación enzimática, tal y como sucede en muchas otras V-H<sup>+</sup>-PPasas, la actividad de la H<sup>+</sup>-PPasa de *P.dicentrarchi* es dependiente de Mg<sup>+2</sup>. Se sabe que las H<sup>+</sup>-PPasas vacuolares requieren ambos, Mg<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup>, en adición a PPi, para completar su actividad (Leigh y col., 1992; Islam y col., 2003). Sin embargo, también ha sido descrito que un exceso de PPi así como un exceso de Mg<sup>+2</sup> puede inhibir la actividad de la enzima (Maeshima y Yoshida, 1989). El Mg<sup>+2</sup> es esencial ya que actúa como activador de la hidrólisis del PPi, al tratarse de un componente del sustrato



real de la  $H^+$ -PPasa, el complejo  $Mg^{+2}$ -PPi, por lo que en los ensayos de actividad enzimática, el tampón de reacción se suplementa con  $MgCl_2$  o  $MgSO_4$  (Sosa y col., 1992; Maeshima, 2000). La actividad de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* también es altamente dependiente de ambos, PPi y  $Mg^{+2}$  y se muestra significativamente inhibida por el NaF, un potente inhibidor específico de las PPasas (Baykov y col., 2000; Mallo y col., 2015). A través del estudio del patrón de inhibición por el NaF en la PPasa de levaduras, se piensa que este actúa por reemplazo del sitio activo de unión a  $Mg^{+2}$  (Pohjanjoki y col., 2001).

La V- $H^+$ -PPasa juega un rol importante en el mantenimiento del pH de citoplasma y vacuolas, vía la translocación de  $H^+$  del citosol hacia el lumen vacuolar, a expensas de la hidrólisis de PPi (Pan y col., 2011). En plantas, los circuitos quimioosmóticos están dirigidos por gradientes de  $H^+$  que median el transporte activo secundario de compuestos a través de la membrana plasmática y endosomal, provocando una regulación de la acidificación que es crítica para las rutas secretoras y endocíticas (Baltscheffsky y col., 1999; Gaxiola y col., 2007). En *P. dicentrarchi*, el transporte de  $H^+$  inducido por el PPi, se ha detectado por medición de los cambios en la fluorescencia de un colorante sensible al pH, el naranja de acridina (Mallo y col., 2015). Mediante este ensayo, al igual que se ha observado en otros organismos, parte del colorante se acumula en ausencia de fuentes de energía y una vez llega a un estado estable, la adición de PPi lleva a un mayor consumo del colorante, lo que indica el establecimiento de un gradiente de  $H^+$  a través del compartimento de la membrana subcelular, incrementándose la acidificación del orgánulo (Rodrigues y col., 1999). En este ciliado, la actividad fue bloqueada, además de por la adición de NaF, por el análogo del PPi, PAM, un inhibidor competitivo de la  $H^+$ -PPasa (Szabo y Oldfield, 2001).

Como ya se ha comentado anteriormente, las  $H^+$ -PPasas de eucariotas están asociadas a ciertos compartimentos ácidos del sistema de

endomembranas: la vacuola y los lisosomas en las células vegetales y los acidocalcisomas en protozoos tripanosomátidos y apicomplejos (Pérez-Castiñeira y col., 2002b; Scott y Docampo, 2000; Docampo y col., 2005). Algunas de las funciones de los acidocalcisomas son actuar como reservorios de cationes y mantener la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  y del pH intracelular, así como la osmorregulación (Moreno y Docampo, 2009; Docampo y col., 2013). Los acidocalcisomas en protozoos parásitos también interactúan con otros orgánulos como la vacuola contráctil y otras vacuolas asociadas con la ruta endosomal/lisosomal (Moreno y Docampo, 2009; Docampo y col., 2010) y, aunque en ciliados no se han caracterizado hasta la fecha, se piensa que también podrían existir en estos protozoos (Plattner y col., 2012). En *Paramecium caudatum*, ha sido descrita la acidificación de vacuolas fagocíticas que ocurre a través de la fusión no lisosomal de vesículas, llamadas acidosomas, con la liberación de nuevas vacuolas. Estas vesículas acumulan rojo neutro y naranja de acridina, lo que demuestra la naturaleza ácida de su contenido (Allen y Fok, 1983) y, aunque existen secuencias nucleotídicas de las  $\text{H}^+$ -PPasas de ciliados depositadas en las bases de datos (ej; *Tetrahymena thermophila*; número de acceso en el GenBank XM\_001011583 o *Tetrahymena pyriformis*, numero de acceso en el GenBank, AJ251772), ello aporta muy poca información acerca del papel fisiológico de la enzima en estos organismos (Pérez-Castiñeira y col., 2001a).

La eficiencia en la exclusión del exceso de  $\text{Na}^+$  desde el citoplasma, y su acumulación en las vacuolas, son los dos hechos más importantes en el mantenimiento de la homeostasis celular en plantas. En estas funciones intervienen los transportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizados en el tonoplasto y la membrana plasmática, los cuales excluyen  $\text{Na}^+$  del citosol a través de la utilización de la fuerza protón motriz generada por la  $\text{H}^+$ -ATPasa y la  $\text{H}^+$ -PPasa (Silva y Gerós, 2009). Al igual que en plantas, en tripanosomátidos y apicomplejos estas bombas colocan en acidocalcisomas y vacuolas

(Marchesini y col., 2000; Saliba y col., 2003; Moriyama y col., 2003), por lo que estas enzimas también pueden ver afectada su expresión en diferentes condiciones de salinidad; por ejemplo: las  $H^+$ -PPasas de algas y plantas ven inducida su actividad bajo condiciones de estrés salino (Carystinos y col., 1995; Fukuda y col., 2004). La sobreexpresión de la isoforma de la  $H^+$ -PPasa vacuolar, AVP1, en el modelo de plantas *Arabidopsis*, se caracteriza por conferir tolerancia frente a la salinidad elevada y la sequía (Gaxiola y col., 2001). Los ciliados son organismos eurihalinos que se adaptan particularmente bien a los cambios de salinidad, pudiendo habitar en condiciones de salinidad variables, desde un 4‰ a un 62‰, cifra muy superior a la de la salinidad del agua de mar (Hu, 2014). Sin embargo, de igual modo que sucede en el caso de plantas, frente a condiciones de estrés salino, *P. dicentrarchi* es capaz de responder mediante cambios en la expresión de la  $H^+$ -PPasa, indicando un papel potencial en ésta en la tolerancia al NaCl y la osmorregulación en los escuticociliados marinos.

Se ha comprobado que la expresión génica de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* se ve incrementada en condiciones de menor salinidad; estos datos se correlacionan con la actividad translocadora de  $H^+$ , la cual se ve inhibida por la adición de NaCl. Esta inhibición por NaCl no es un hecho frecuente en las  $H^+$ -PPasas, en las que, por ejemplo, en el caso de plantas, ven incrementada su actividad bajo condiciones de estrés salino (Fukuda y col., 2004; Liu y col., 2010). Sin embargo, en el tripanosomátido *Herpetomonas* también se ha comprobado al igual que sucede en *P. dicentrarchi*, que con la adición de NaCl no tiene lugar la actividad translocadora de protones (Soares Medeiros y col., 2005) y en *L. donovani*, la actividad PPasa se vio estimulada por el KCl, mientras que la utilización de NaCl a la misma concentración, resultó en la pérdida de actividad (Sen y col., 2009), lo que descartó la posibilidad de que este efecto estuviese producido por cambios en la osmolaridad. Recientemente se ha publicado un estudio redefiniendo la

clasificación de las  $H^+$ -PPasas; en él se presenta una subclase de estas enzimas caracterizada por su inhibición por  $Na^+$ , pero hasta el momento, este fenómeno solo se ha detectado en procariotas y se cree que es un vestigio evolutivo (Luoto y col., 2013; 2015). En el caso de *P. dicentrarchi*, el  $Na^+$  podría actuar a nivel de la alcalinización de la vacuola a través de la regulación de los transportadores de  $Na^+/Ca^{+2}$  y de  $Na^+/H^+$  del ciliado (Vercesi y col., 2000), los cuales se piensa que podrían estar presentes, aunque en relación a ello solamente se conoce una secuencia parcial del transportador de  $Na^+/Ca^{+2}$  y no ha sido caracterizado todavía. Se han realizado varias investigaciones acerca de la regulación del transportador de  $Na^+/H^+$  en diversos organismos, incluidos los ciliados (Kramhøft y Jessen, 1992; Vercesi y col., 2000; Bonansea y col., 2012). En *Trypanosoma cruzi*, el transportador de  $Na^+/H^+$  tiene 11 dominios transmembrana, está localizado en las vacuolas ácidas de los epimastigotes y se modula en condiciones de estrés salino. En ambientes de estrés hiperosmótico se produce la activación de esta enzima, produciéndose la alcalinización de las vacuolas ácidas con una consecuente liberación de calcio (Pittman, 2011; Bonansea y col., 2012), lo cual también sucede en plantas (Fukuda y col., 2004). En otros parásitos se ha estudiado la implicación del intercambiador  $Na^+/H^+$  en la regulación del pH (Vercesi y col., 2000; Docampo y col., 2005) y se ha comprobado que su actividad está regulada conjuntamente con las actividades de la  $H^+$ -PPasa y la  $H^+$ -ATPasa, que le proporcionan la fuerza motora necesaria para su funcionamiento (Maeshima y col., 2001; Silva y Gerós, 2009).

La regulación del  $Na^+$  en *P. falciparum* implica cambios en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa (Spillman y col., 2013), que se encuentra activada en condiciones ácidas (Van der Heyden y Docampo, 2002). A través de la secuenciación del genoma completo de algunas especies de ciliados, fue posible identificar los genes que codifican para las V- $H^+$ -ATPasas, unas bombas de ATP que conducen  $H^+$  a través de las membranas y que en

*Paramecium* son cruciales en la acidificación de la vacuola digestiva (Plattner, 2010) y parecen tener una función principal en la osmorregulación y el mantenimiento de la homeostasis del pH, además del volumen celular (Van der Heyden y Docampo, 2002; Wassmer y col., 2005). En este trabajo se ha intentado localizar funcionalmente esta proteína en el ciliado *P. dicentrarchi*, a través del empleo de un ensayo de translocación de  $H^+$  con naranja de acridina, del mismo modo que se ha estudiado el funcionamiento de esta enzima en diversos organismos y al igual que para el caso de la  $H^+$ -PPasa. En el ciliado *P. dicentrarchi*, a diferencia de lo que sucede en otros organismos (Rodrigues y col., 1999; Ruíz y col., 2001), el ATP no estimula la actividad translocadora de  $H^+$  en células permeabilizadas con digitonina. La  $H^+$ -ATPasa se ha descrito como una enzima insensible a  $Ca^{+2}$ , a diferencia de la  $H^+$ -PPasa (Rea y col., 1992a), por lo que el bloqueo total de esta actividad por el  $Ca^{+2}$  puede ser un indicativo de que solo se está llevando a cabo por medio de la  $H^+$ -PPasa. La inhibición de la  $H^+$ -PPasa por el  $Ca^{+2}$  parece que ocurre a través del complejo  $CaPPi$  que se forma y que compite con el sustrato de la enzima, y/o el  $Ca^{+2}$  que mimetiza al  $Mg^{+2}$ , resultando en una inhibición de la actividad de la misma (Maeshima y col., 1991; Rea y col., 1992a). En *P. dicentrarchi* el  $CaCl_2$ , a una concentración de 0,8 mM, indujo la eliminación de  $H^+$ , al igual que el  $NH_4Cl$ , que se usa como alcalinizador, eliminando los  $H^+$  de las vacuolas (Docampo y col., 1995). Asimismo, la liberación de  $H^+$  en consecuencia a la adición de  $Ca^{+2}$  en *P. dicentrarchi* puede sugerir la existencia de un cotransportador de  $Ca^{+2}/H^+$  en los compartimentos ácidos, al igual que ocurre en otros organismos (Soares Medeiros y col., 2005). Una vez bloqueada la actividad translocadora mediante el uso de  $Ca^{+2}$ , se añadió ATP para ver si en estas condiciones era capaz de inducir la translocación por medio de una  $H^+$ -ATPasa, al igual que se ha realizado en otras investigaciones (Rea y col., 1992a); sin embargo, esto tampoco fue capaz de activar la translocación de  $H^+$  en el ciliado. Este fenómeno también se ha observado en

el tripanosomátido *Herpetomonas*, en el que mediante el estudio de la actividad translocadora de  $H^+$  no se evidencia la existencia de una  $H^+$ -ATPasa (Soares Medeiros y col., 2005). En *Streptococcus faecalis*, la actividad de una sPPasa resultó estar inhibida por ATP, lo cual se ha visto que compite por el PPi para la quelación de iones  $Mg^{+2}$  (Lahti y Lonnberg, 1985), siendo el sustrato primario del enzima el  $Mg_2PPi$ . Otra hipótesis para explicar la alcalinización debida al ATP en *P. dicentrarchi*, podría ser la inhibición de la  $H^+$ -PPasa debida a un exceso de formación de Pi como producto del metabolismo del ATP ( $ADP + Pi$ ), ocasionado por un exceso de ATP.

La  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi*, tal y como se ha descrito anteriormente, se localiza en la membrana de vacuolas y en los sacos alveolares, dos componentes celulares de clara naturaleza ácida, revelada a través de la tinción con dos colorantes fluorescentes sensibles a pH: el naranja de acridina y el LysoTracker Red DND-99. Además, como se muestra en las imágenes, existe un gran dinamismo entre el pH del interior de los sacos alveolares y de las vacuolas endocíticas, que probablemente refleje el papel de estos compartimentos celulares en la regulación del pH intracelular, de manera análoga a lo que sucede en los acidocalcisomas de otros protozoos parásitos (Docampo y col., 2013). Este mismo patrón de distribución también se ha observado para el  $Ca^{+2}$ , el cual se almacena en compartimentos ácidos, coincidiendo con la  $H^+$ -PPasa. En las fotografías de microscopía electrónica (TEM), pueden observarse algunos depósitos electrodensos, tanto en la región citosólica como en algunos sacos alveolares, en donde se localiza la  $H^+$ -PPasa (Mallo y col., 2015). Los depósitos electrodensos son también característicos en acidocalcisomas (Miranda y col., 2000, 2004, 2008; Soares-Medeiros y col., 2005), los cuales comparten algunas de sus características con los sacos alveolares de *P. dicentrarchi*, como su origen ácido, su actuación como reservorios de  $Ca^{+2}$  y por poseer enzimas implicadas en la acidificación, como la  $H^+$ -PPasa. Adicionalmente, como puede visualizarse con la tinción con



naranja de acridina y la inmunolocalización, los sacos alveolares están localizados bajo los cilios, indicando el papel de este orgánulo en el movimiento ciliar y/o la bioenergética (Plattner y Klauke, 2001). La  $H^+$ -PPasa podría intervenir en la liberación de  $Ca^{+2}$  desde los compartimentos internos, al localizarse éste en orgánulos que actúan de depósitos del mismo, e intervenir en el mantenimiento del pH gracias a la translocación de  $H^+$ , lo cual se sabe que es fundamental para regular el transporte de  $Ca^{+2}$  almacenado en los compartimentos ácidos (Vercesi y col., 2000). Los sacos alveolares ya habían sido descritos como almacenes de  $Ca^{+2}$  en protozoos alveolados (Stelly y col., 1991), y la vacuola contráctil de *Paramecium* y *Dyctiostelium discoideum* también parece ser de gran importancia para la regulación de la concentración interna de  $Ca^{+2}$  (Stock y col., 2002, Pittman, 2011; Martínez-Higuera y col., 2013). La regulación de la concentración de  $Ca^{+2}$  ha sido frecuente objeto de estudio debido a su importancia por la multitud de funciones en las que participa, así como por su esencialidad para la supervivencia celular.

Dado que los canales de  $Ca^{+2}$  del ciliado parecen modularse también por la salinidad, en *P. dicentrarchi* se ha investigado el efecto de diferentes concentraciones de NaCl y la adición del PPI, que actuaría de sustrato sobre la  $H^+$ -PPasa, sobre los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelulares, observándose que el PPI actúa bajando estos niveles, al igual que en las condiciones de menor salinidad, en las que la translocación de  $H^+$  está activa. Por otra parte, estos niveles de  $Ca^{+2}$  intracelulares se ven modulados por el bisfosfonato RIS, el cual realiza un efecto contrario al PPI, incrementando los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular, lo que parece confirmar que la  $H^+$ -PPasa podría estar actuando a nivel de regulación de los depósitos de  $Ca^{+2}$ . Esto podría explicarse del siguiente modo: al estar la enzima bloqueada por la adición del análogo del PPI, RIS, no se estarían introduciendo  $H^+$  en las vacuolas, por lo que al desaparecer los  $H^+$ , el transportador de  $Na^+/H^+$  vacuolar, de estar este



presente, no estaría funcionando y por tanto no saldría el  $\text{Ca}^{+2}$  de las vacuolas a través del transportador de  $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$  asociado, por lo que los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intravacuolar se incrementarían. El proceso contrario se produciría al inducir la translocación de  $\text{H}^{+}$  por la  $\text{H}^{+}$ -PPasa utilizando el PPi: ello aumentaría la actividad del transportador de  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ , resultando en un mayor ciclado de  $\text{Ca}^{+2}$  hacia el citosol, sucediendo del mismo modo en que ha sido descrito en otros organismos, en los que la liberación del  $\text{Ca}^{+2}$  está favorecida por un gradiente entre el  $\text{Na}^{+}$  extracelular e intravacuolar a través del transportador de  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ , que alcaliniza las vacuolas liberando  $\text{Ca}^{+2}$ , y cuando este transportador es inhibido; el  $\text{Ca}^{+2}$  no se libera y, en consecuencia, aumenta el  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico (Bonansea y col., 2012). La modulación del  $\text{Ca}^{+2}$  por los bisfosfonatos es un hecho conocido, por el cual se emplean en diversos procesos patológicos relacionadas con el mismo (Rodan y Fleish, 1996). En cuanto a la modulación de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelulares por la salinidad, el  $\text{Na}^{+}$  podría actuar de forma análoga al RIS, ya que, este resulta también inhibidor de la actividad de la  $\text{H}^{+}$ -PPasa.

Recientemente, se han identificado en *Paramecium* homólogos de los receptores de rianodina e inositol 1, 3, 4-trifosfato (RyR y  $\text{IP}_3\text{R}$ , respectivamente), que se localizan en diferentes orgánulos que participan en el tráfico de vesículas (Ladenburger y col., 2009; Plattner y col., 2012). Según el modelo propuesto por Plattner para *Paramecium* (Plattner, 2014), el  $\text{Ca}^{+2}$  se obtiene por dos vías principales: introduciéndose desde el exterior celular a través de la membrana, o bien movilizándose desde almacenes celulares internos, como los sacos alveolares o el RE, por ejemplo. La liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde los depósitos internos parecer estar controlada por el receptor  $\text{IP}_3\text{R}$ , que podría estar asociado también con el sistema osmorregulador. Los canales asociados con los RyR están localizados en los depósitos de  $\text{Ca}^{+2}$  corticales de los sacos alveolares y están activados durante la exocitosis, momento en el que estos orgánulos no funcionan como almacén de  $\text{Ca}^{+2}$

(Plattner y col., 2012; Plattner, 2015b). Se ha postulado que el secuestro de  $\text{Ca}^{+2}$  podría tener lugar a través de un transportador de  $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$  acoplado a la actividad de la  $\text{H}^{+}$ -ATPasa vacuolar, pero este no ha sido identificado todavía (Plattner, 2015a; b). Los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólicos están también controlados por una  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, la cual regula, entre otras muchas, las actividades de exo y endocitosis (Docampo y Huang, 2015; Plattner, 2015b). Esta enzima, en *Paramecium*, ha sido descrita en el retículo endoplasmático y en los sacos alveolares y en *E. histolytica* se ha identificado en membranas y vesículas internas (Hauser y col., 1998; Kissmehl y col., 1998; Nagamune y col., 2007). A nivel de la membrana, la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa de *Paramecium* se activa para eliminar  $\text{Ca}^{+2}$  cuando la concentración de éste está en valores relativamente altos (Stelly y col., 1995). En *P. dicentrarchi* no ha sido descrita por el momento, pero el hecho de que los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular aumenten con la adición de  $\text{Ca}^{+2}$  y ATP, y sin embargo no incrementen con la adición de la artemisinina (ART), un conocido inhibidor de la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa en Apicomplexa y Kinetoplastida (Mishina y col., 2007; Nagamune y col., 2007; Tanabe y col., 2011), parece indicar que es posible que esta enzima esté presente en el ciliado. En el caso de la cloroquina (CQ), ha podido observarse, que a diferencia de la ART, no parece actuar a nivel de regulación de la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa.

En diversos organismos se ha observado el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático en presencia de elevadas concentraciones de ATP extracelulares. Este ATP extracelular también puede inducir la producción de ROS y estimular el incremento en los niveles de ARNm de genes regulados por  $\text{Ca}^{+2}$  y por estrés (Jeter y Roux, 2006); sin embargo, el ATP parece hacer disminuir los niveles de expresión de la enzima  $\text{H}^{+}$ -PPasa en *P. dicentrarchi*, tanto proteicos como de expresión génica, al igual que su inhibidor, el  $\text{Ca}^{+2}$ , por lo que se sugiere que el ATP inhibe la actividad y expresión de la  $\text{H}^{+}$ -PPasa. Este fenómeno podría ser debido a que

en condiciones de exceso de ATP y  $\text{Ca}^{+2}$ , la bomba de  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa estaría sobreexpresada, la cual interactuaría con los transportadores de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+}$ , por lo que no se precisaría del bombeo de  $\text{H}^{+}$  de la  $\text{H}^{+}$ -PPasa para movilizar el  $\text{Ca}^{+2}$ .

La ART está descrita como un inhibidor de la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa y otros canales iónicos (Nagamune y col., 2007). El empleo de este antimalárico en el ciliado podría modular los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y por tanto desregular su homeostasis, llegando a poseer un efecto antiparasitario, tal y como se ha comprobado en este trabajo, causando una inhibición del crecimiento del escuticociliado. Este efecto de inhibición de crecimiento también se ha podido comprobar con el empleo de otro antimalárico, la CQ, que ocasiona un descenso en la tasa de crecimiento de *P. dicentrarchi* en cultivo *in vitro*, lo que evidencia la capacidad del empleo de estos compuestos en el tratamiento de la escuticociliatosis. La actividad antiparasitaria de la ART ya había sido descrita previamente en otros ciliados como por ejemplo, *Tetrahymena thermophila* (Shen y col., 2010).

Del mismo modo que ocurre con el  $\text{Na}^{+}$  (Vercesi y col., 2000), la adición de fármacos catiónicos como la CQ provoca una rápida alcalinización de los acidocalcisomas y vacuolas ácidas, lo que según varios estudios podría ser su principal mecanismo de acción, ya que produciría desregulaciones en la actividad de las enzimas presentes en esos compartimentos (Vercesi y Docampo, 1997; Dzekunov y col., 2000, Gazzarini y col., 2007). Teniendo esto en cuenta, las enzimas localizadas en esos compartimentos podrían ser dianas de este fármaco antimalárico. Así, algunas investigaciones proponen que la CQ podría activar al transportador de  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  de la membrana plasmática, aunque se trata de una hipótesis muy controvertida (Wünsch y col., 1998; Bray y col., 1999); sin embargo, en *P. dicentrarchi* se ha podido observar que este fármaco, además de producir una alcalinización afecta a la expresión génica de la  $\text{H}^{+}$ -PPasa, lo que podría ser el causante de su actividad

antiparasitaria. Este bloqueo en la translocación de  $H^+$  inducida por PPI por la CQ también ha podido observarse en el modelo murino de la malaria, *Plasmodium berghei*, reforzando la hipótesis de la intervención de esta enzima en el mecanismo de acción de la CQ, como ha sido sugerido recientemente (Jovel y col., 2014). Además, en el caso de *P. dicentrarchi*, la CQ bloquea la translocación de  $H^+$  estimulada por PPI, a dosis más bajas que las empleadas para otros compuestos estudiados en el ciliado. Sin embargo, la ART, el otro antimalárico utilizado, incrementa la actividad translocadora de  $H^+$ , incrementando la acidificación vacuolar.

Existen evidencias de que la ART realiza su actividad antimalárica, al menos en parte a través de la generación de estrés oxidativo (Krungkrai y Yuthavong, 1987; Klonis y col., 2011). Con la adición de  $H_2O_2$ , se produce una acidificación en el citosol y una alcalinización en la vacuola digestiva en parásitos de la malaria, a través de la inhibición de la  $H^+$ -ATPasa, mientras que no se ha detectado ningún efecto sobre la  $H^+$ -PPasa (van Schalwyk y col., 2013). En *P. dicentrarchi*, sin embargo, la ART actúa incrementando la actividad translocadora, produciendo también una desregulación del pH pero a través de la acidificación en lugar de la alcalinización, efecto que coincide con lo observado en compartimentos ácidos de otros parásitos (Gazarini y col., 2007).

Hemos analizado también el efecto de la CQ y la ART en la acidificación celular en *P. dicentrarchi*, utilizando el colorante naranja de acridina que, como ya hemos descrito anteriormente, muestra diferente coloración dependiendo de la acidez. Con este experimento hemos podido visualizar el efecto acidificador de la ART, con respecto al control, y el efecto alcalinizador de la CQ, actuando ambos compuestos de un modo dependiente de la dosis. En los parásitos de la malaria, ha sido descrita la desregulación del pH tanto citosólico como vacuolar, no solo por la  $H^+$ -PPasa si no también por la  $H^+$ -ATPasa (Marchesini y col., 2000). Cuando los parásitos son

expuestos a CQ, la liberación de  $H^+$  interfiere en la regulación del pH, por lo que las enzimas implicadas en su mantenimiento podrían ver su expresión modulada (Saliba y col., 2003), como sucede en el caso de *P. dicentrarchi*. En *P. falciparum*, tratados con concentraciones subletales de CQ durante 3 días, se observó un incremento en la expresión de dos genes implicados en la acidificación vacuolar, la  $H^+$ -ATPasa y la  $H^+$ -PPasa independiente de  $K^+$  - *PfVp2*- (McIntosh y col., 2001, Mwai y col., 2012); sin embargo, en *P. dicentrarchi*, la expresión de la  $H^+$ -PPasa se ve disminuida tras 24h de tratamiento con CQ. Estos resultados parecen indicar que esta enzima podría ser una diana en el mecanismo de acción de la CQ, confirmándose por primera vez, su actividad antiparasitaria en este ciliado.

Por otra parte, el efecto inhibitorio de la ART en la expresión génica de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi*, podría explicarse como un mecanismo de defensa del ciliado para prevenir un mayor incremento del pH intravacuolar (van Schalwyk y col., 2013), debido en parte a la inhibición de la  $Ca^{+2}$ -ATPasa vacuolar y por tanto al bloqueo de la salida de  $H^+$ . El papel de la  $Ca^{+2}$ -ATPasa como diana quimioterapéutica también ha sido estudiado en parásitos (Luo y col., 2004; Galizzi y col., 2013).

Por otra parte, las pirofosfatasas solubles, las sPPasas, se han propuesto como dianas quimioterapéuticas atractivas debido a su implicación en el crecimiento e infección en parásitos como *T. gondii*, *Leishmania* y *T. brucei* (Lemercier y col., 2004; Espiau y col., 2006; Pace y col., 2011); sin embargo, las sPPasas de *P. dicentrarchi* no han sido identificadas por el momento y, por tanto, se requieren más estudios para caracterizarlas. Por otra parte, se ha demostrado, que los inhibidores de la  $H^+$ -PPasa, como los bisfosfonatos, tienen efecto antiparasitario y están siendo investigados como posibles tratamientos antiparasitarios (Docampo y Moreno, 2008; Sen y col., 2009). Los bisfosfonatos pueden actuar como inhibidores de enzimas que emplean el PPi como substrato. Existen diversos estudios que enfatizan el efecto

inhibitorio de los bisfosfonatos en otros tipos de PPasas como, por ejemplo, la isomerasa pirofosfatasa o la farnesil pirofosfatasa sintasa, en las que estos compuestos actúan modulando tanto la actividad enzimática como la expresión génica (Rodan, 1998; Van Beek y col., 1999; Rogers y col., 2000; Montalvetti y col., 2001; 2003; Szajnman y col., 2012). También ha sido descrito que los bisfosfonatos controlan la reorganización del citoesqueleto, la fusión vesicular y la apoptosis (Rodrigues y col., 2000) y se ha demostrado su acción como inhibidores del crecimiento de protozoos, como por ejemplo *T. gondii* (Zhen y col., 1994; Docampo y Moreno, 2001; Szabo y col., 2001; Drozdowicz y col., 2003; Kotsikourou y col., 2005). Como hemos comentado con anterioridad, es conocido que los bisfosfonatos tienen un efecto antiparasitario tras haberse ensayado frente a *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium*, sobre amebas de vida libre como *Dictyostelium*, o sobre amebas anfizoicas como *Naegleria fowleri*; todos ellos protozoos provistos de  $H^+$ -PPasas (Rogers y col., 1994: 2000; Rodrigues y col., 1999; Martin y col., 2001; Montalvetti y col., 2001; Docampo y Moreno 2001). Este efecto antiparasitario se ha descrito también recientemente en *P. dicentrarchi* (Mallo y col., 2015), en el que se han probado tres bisfosfonatos diferentes: PAM, RIS y AMDP, mostrando todos ellos una inhibición en el crecimiento del ciliado, resultando ser el RIS, el bisfosfonato más efectivo de los estudiados frente a *P. dicentrarchi*. La actividad translocadora de  $H^+$  resulta inhibida totalmente por PAM y parcialmente por RIS, sin embargo, el AMDP no parece tener efecto, incluso a dosis relativamente altas, contrariamente a lo que ocurre en otros protozoos parásitos, como por ejemplo *Trypanosoma brucei* (Rodrigues y col., 1999). Esto podría deberse a que, tal y como se ha descrito, la especificidad y efecto del AMDP y otros análogos del PPI, como inhibidores competitivos, puede ser dependiente de la concentración de PPI (Drozdowicz y col., 2003). No obstante, todos los bisfosfonatos empleados provocaron un descenso en los



niveles de expresión génica de la  $H^+$ -PPasa. Adicionalmente, los datos obtenidos en *P. dicentrarchi*, muestran la capacidad de los bisfosfonatos como inhibidores de las sPPasas, produciéndose un descenso en los niveles de PPI consumido en células incubadas en presencia de RIS. Este hecho también se ha descrito en *T. gondii* (Rodrigues y col., 2000). Por otra parte, también se ha observado en el ciliado que con la adición de CQ, la cual inhibe el transporte de  $H^+$  mediado por el PPI, se produce un descenso en los niveles de PPI consumidos.

Por todo ello queda demostrado el potencial de los antimaláricos y los bisfosfonatos como posibles tratamientos frente a la escuticociliatosis, así como la importancia del metabolismo del PPI en la supervivencia del parásito.

Por tratarse *P. dicentrarchi* del agente etiológico de una de las principales parasitosis del rodaballo en cultivo, es de especial interés localizar posibles dianas quimioterapéuticas en el ciliado. Teniendo en cuenta que se trata de un parásito de fácil cultivo *in vitro*, al igual que se ha descrito en otros parásitos, posee las características idóneas para garantizar el estudio de su metabolismo (Kidder y Dewey, 1951). En este trabajo nos hemos centrado principalmente en la búsqueda de posibles dianas relacionadas con los mecanismos bioenergéticos y el estrés, que entendemos que pueden ser relevantes durante el proceso infeccioso en el pez, especialmente al tratarse de un parásito oportunista.

El orgánulo encargado del metabolismo energético por excelencia, es la mitocondria. En los últimos años se han desarrollado avances considerables en la caracterización de la ruta de la respiración mitocondrial alternativa resistente a KCN, la cual mediante el empleo de la AOX contribuye al crecimiento, a la resistencia a medios hiperosmóticos y a la acumulación de metabolitos secundarios en algunos parásitos como *Leishmania* (Sitaramam y col., 2008), por lo que se trata de una diana terapéutica interesante para hacer frente a la escuticociliatosis del rodaballo en cultivo, teniendo además en



cuenta que esta diana no está presente en el hospedador. El hecho de que la AOX pueda ser una diana quimioterapéutica interesante queda demostrado con la evidente capacidad antiparasitaria de los fármacos estudiados frente a esta enzima, como el PG. Un conocimiento más profundo de la estructura de esta proteína así como su secuencia génica sería interesante para poder realizar un diseño de fármacos más racional.

En este estudio se demuestra que el ciliado *P. dicentrarchi* posee una bomba de  $H^+$  dependiente de PPi que se asemeja mucho a la  $V-H^+$ -PPasa tipo I de plantas (Mallo y col., 2015). Esta proteína está descrita como esencial para el crecimiento y viabilidad celular en diversidad de organismos, incluidos los parásitos (Chen y col., 1990; McIntosh y col., 2001; Islam y col., 2005), por lo que se establece como una diana atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos quimioterapéuticos y vacunas frente a las infecciones parasitarias (Xie y col., 2013). Los resultados que se muestran constituyen la primera caracterización funcional y molecular de una  $H^+$ -PPasa de tipo I en el escuticociliado parásito *P. dicentrarchi* (GenBank: KF135294.1) (Mallo y col., 2015). La aparente carencia de la  $V-H^+$ -PPasa en las células de mamíferos y otros hospedadores hace que esta enzima sea una diana quimioterapéutica específica potencial frente a diversas parasitosis (Luo y col., 1999; McIntosh y Vaidya, 2002). La clase de fármacos más evidente para el desarrollo de compuestos terapéuticos potenciales frente a esta diana incluiría a los análogos del PPi que actúan como inhibidores competitivos de la  $V-H^+$ -PPasa, como es el caso de los bisfosfonatos (Baykov y col., 1993), cuyo uso ya se encuentra estandarizado (Russell y Rogers, 1999).

La localización de la  $H^+$ -PPasa en orgánulos ácidos, como las vacuolas que son requeridos para una gran variedad de funciones, incluyendo la degradación proteica, el almacenamiento y el turgor, el control y secuestro de los compuestos tóxicos y la regulación del pH (Pittman, 2011) es un hecho muy interesante a tener en cuenta a la hora de valorar su potencial como diana

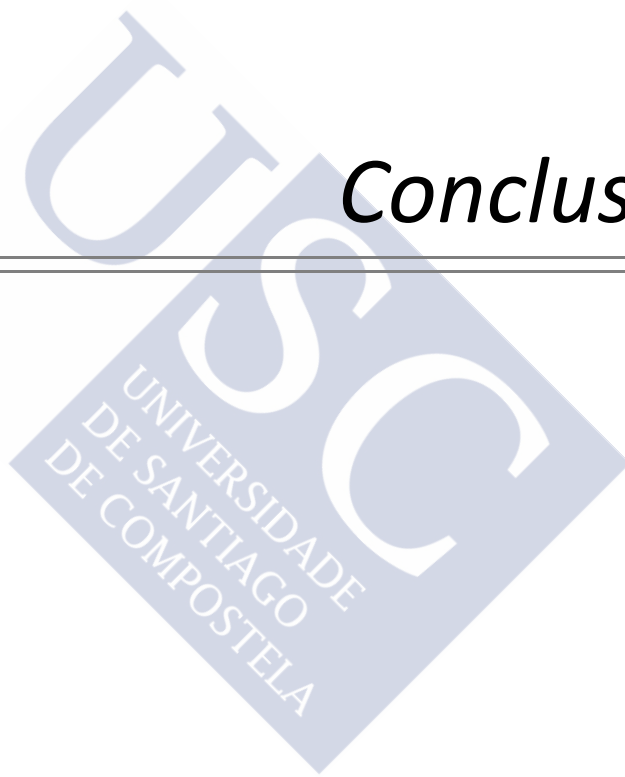
quimioterapéutica. La homeostasis del pH en compartimentos intracelulares parece ser muy importante bajo condiciones patológicas (López y Latorre, 2008), por lo que cualquier enzima implicada en su mantenimiento podría ser una diana terapéutica interesante (Martínez y col., 2002). La  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* está localizada en la membrana de vacuolas y en sacos alveolares, promoviendo la acidificación de estos compartimentos celulares e interviniendo en la respuesta adaptativa de los ciliados para el mantenimiento de la homeostasis del  $Ca^{+2}$  y el pH intracelular así como la osmorregulación, realizando los sacos alveolares funciones análogas a las que realizan los acidocalcisomas de los apicomplejos y los tripanosomátidos (Docampo y col., 2005). Esta enzima posee una gran importancia a nivel fisiológico y en el metabolismo bioenergético. Dado que hasta la fecha no existe ninguna evidencia de la existencia de una  $H^+$ -PPasa vacuolar en los hospedadores, la caracterización de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* para el análisis de la función de su estructura y el desarrollo de nuevas estrategias quimioterapéuticas para el control de la escuticociliatosis resulta muy relevante (Hill y col., 2000; Sen y col., 2009). La secuencia de la  $H^+$ -PPasa indica que es un auténtico miembro de la familia de las V- $H^+$ -PPasas definida en plantas y en bacterias y el análisis de la función de los inhibidores de la  $H^+$ -PPasa de *P. dicentrarchi* en la supervivencia del parásito determinan su validez como una posible diana terapéutica. Además, por su importancia en el metabolismo, esta enzima podría constituir un antígeno interesante a la hora de desarrollar una vacuna, como se ha realizado con la PPasa inorgánica soluble frente a *Baylisascaris* (Xie y col., 2013). Finalmente, aparte de la importancia de las enzimas como las  $H^+$ -PPasas como dianas potenciales para el desarrollo de agentes terapéuticos (vacunas y medicamentos) que podrían utilizarse contra parasitosis del hombre y animales, incluidas enfermedades de importante impacto en la acuicultura como la escuticociliatosis, estas moléculas altamente conservadas desde las bacterias hasta los protozoos y plantas, tienen un

enorme interés para dilucidar importantes aspectos sobre la evolución de estos organismos y, especialmente, sobre su adaptación al parasitismo.



# *Conclusiones*

---



- 1.- El escuticociliado *Philasterides dicentrarchi* se comporta como un microorganismo microaerófilo que posee una cadena de transporte de electrones ramificada en dos rutas: una clásica y otra alternativa, presentando esta última una oxidasa alternativa monomérica en la membrana mitocondrial. Esta enzima tiene un tamaño aproximado de 42 kDa y su expresión varía dependiendo de la concentración de oxígeno del medio y de la fase de crecimiento del ciliado, el cual emplea la ruta alternativa en las primeras fases de crecimiento y bajo condiciones de restricción de oxígeno.
- 2.- Los inhibidores de la oxidasa alternativa, como el propilgalato y el resveratrol, provocan una disfunción mitocondrial y la inhibición del crecimiento del ciliado, por lo que la posibilidad de utilizar estos compuestos polifenólicos no tóxicos podría ser explotada como una nueva terapia anti escuticociliatosis, especialmente teniendo en cuenta la ausencia de oxidasa alternativa en el hospedador.
- 3.- *Philasterides dicentrarchi* posee una pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones de unos 62 kDa, que presenta un dominio común con las proteínas de la subfamilia de las pirofosfatasas inorgánicas translocadoras de protones de tipo I, caracterizadas por su dependencia del  $K^+$ . Posee una elevada homología con las pirofosfatasas translocadoras de protones de otros ciliados, está estrechamente relacionada filogenéticamente con las pirofosfatasas vacuolares translocadoras de protones de plantas y su actividad es bloqueada por inhibidores estándar de las pirofosfatasas translocadoras de protones como el NaF y los bifosfonatos.
- 4.- El análisis genético e inmunohistoquímico demuestra que *Philasterides dicentrarchi* presenta dos isoformas de la pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones, que se generan a partir de un único gen mediante un proceso de corte y empalme –“*splicing*”- alternativo, y que se localizan en

las membranas de vacuolas citoplasmáticas y sacos alveolares, estructuras acídicas que están relacionadas probablemente con procesos de osmorregulación.

5.- Algunas vacuolas citoplasmáticas y los sacos alveolares se muestran como estructuras tipo acidocalcisoma, similares a las ya descritas en otros protozoos parásitos, que poseen, además de la pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones, un almacén de  $\text{Ca}^{+2}$  en su interior. Estos compartimentos intracelulares intervienen en la acidificación del pH intracelular que, además de por el pirofosfato, es regulado por ATP,  $\text{Ca}^{+2}$  y NaCl, que también participan en la modulación de la expresión de la pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones, indicando el papel clave que posee esta enzima en la regulación del pH intracelular y la osmolaridad.

6.- Fármacos antimaláricos, como la cloroquina y la artemisinina, y análogos del pirofosfato, como los bifosfonatos, presentan una actividad antiparasitaria relacionada con su efecto sobre enzimas del metabolismo del PPI y del  $\text{Ca}^{+2}$ . Concretamente, los bifosfonatos y la cloroquina bloquean la actividad y la expresión de la pirofosfatasa inorgánica translocadora de protones, mientras que la artemisinina bloquea a una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , todas ellas enzimas que participan en la homeostasis del pH intracelular y del  $\text{Ca}^{+2}$ , mecanismos vitales para la supervivencia del parásito, lo que demuestra que estas enzimas son moléculas diana clave para el desarrollo de nuevos fármacos contra la escuticociliatosis.

7.- La existencia de genes típicos de plantas, relacionados con procesos bioenergéticos que se activan en situaciones de estrés oxidativo y osmótico en el genoma de *Philasterides dicentrarchi*, como la oxidasa alternativa terminal y la pirofosfatasa translocadora de protones, a parte de su indudable interés en la comprensión de los fenómenos evolutivos, también demuestra su íntima

implicación en procesos de adaptación al parasitismo, permitiéndole al ciliado su supervivencia en el hospedador ante las nuevas condiciones que se presentan durante su fase endoparásita, relacionadas con la disponibilidad de oxígeno, alteraciones del pH y osmolaridad.





# *Bibliografía*

---



- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **52**:399-451.
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick RS, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **59**:429-493.
- Affourtit C, Krab K, Moore AL. (2001). Control of plant mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1504**(1):58-69.
- Affourtit C, Albury MS, Crichton PG, Moore AL. (2002). Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Letters*, **510**:121-126.
- Alarcón de la Lastra C, Villegas I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, **35**:1156-1160.
- Albury, MS, Elliott, C, and Moore, AL. (2009). Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiologia Plantarum*, **137**:316-327.
- Allen RD, Fok AK. (1983). Nonlysosomal vesicles (acidosomes) are involved in phagosome acidification in *Paramecium*. *The Journal of Cell Biology*, **97**:566-570.
- Allen RD, Schroeder CC, Fok AK. (1989). Intracellular Binding of Wheat Germ Agglutinin by Golgi Complexes, Phagosomes, and Lysosomes of *Paramecium ultimicron*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **37**:195-202.
- Allen RD, Ma L, Fok AK. (1993). Acidosomes: recipients of multiple sources of membrane and cargo during development and maturation. *Journal of Cell Science*, **106**:411-422.
- Alock F, Webb CT, Dolezal P, Hewitt V, Shingu-Vasquez, Likic VA, Traven A, Lithgow T. A. (2012). Small Tim Homohexamer in the Relict

- Mitochondrion of *Cryptosporidium*. *Molecular Biology and Evolution*, **29**:113-22.
- Alonso M, Lago FC, Gómez-Reino M, Fernández J, Martín I, Vieites JM, Espiñeira M. (2013). Fast Real-Time PCR assay for detection of *Tetramicra brevifilum* in cultured turbot. *Parasitology*, **140**:338-342.
- Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI, Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Palenzuela O, Padrós F, Vázquez S, Nieto JM. (2004). *Cryptosporidium scopthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases in Aquatic Organisms*, **62**:133-145.
- Álvarez-Pellitero P, Pérez A, Quiroga MI, Redondo MJ, Vázquez S, Ríaza A, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A, Nieto JM. (2009). Host and environmental risk factors associated with *Cryptosporidium scopthalmi* (Apicomplexa) infection in cultured turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces, Teleostei). *Veterinary Parasitology*, **165**:207-215.
- Amor Y, Chevion M, Levine A. (2000). Anoxia pretreatment protects soybean cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. *FEBS Letters*, **477**:175-180.
- Andersson ME, Nordlund P. (1999). A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Letters*, **449**:17-22.
- Atta HM, Ahmad MS. (2009). Antimycin-A antibiotic biosynthesis produced by *Streptomyces* Sp. AZ-AR-262: Taxonomy, fermentation, purification and biological activities. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **3**:125-135.
- Bal, MO, Tuner, H. (2014). ESR dosimetry and radical kinetics of gamma-irradiated propyl gallate. *Journal of Molecular Structure*, **1071**:123- 127.
- Baltscheffsky H, von Stedingk LV, Heldt HW, Klingenberg M. (1966). Inorganic pyrophosphate formation in bacterial photophosphorylation. *Science*, **153**:1120-1122.
- Baltscheffsky M, Schultz A, Baltscheffsky H. (1999). H<sup>+</sup>-PPases a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters*. **457**:527-533.
- Bäumer S, Lentjes S, Gottschalk G, Deppenmeier U. (2002). Identification and analysis of proton-translocating pyrophosphatases in the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei*. *Archaea*, **1**:1-7.
- Baykov AA, Dubnova EB, Bakuleva NP, Evtushenko OA, Zhen RG, Rea PA. (1993). Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to

- inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzyme. *FEBS Letters*, **327**:199-202.
- Baykov AA, Kasho VN, Bakuleva NP, Rea PA. (1994). Oxygen exchange reactions catalyzed by vacuolar  $H^{+}$ -translocating pyrophosphatase. Evidence for reversible formation of enzyme-bound pyrophosphate. *FEBS Letters*, **350**:323-327.
- Baykov AA, Cooperman BS, Goldman A, Lahti R. (1999). Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **23**:127-150.
- Baykov AA, Fabrichniy IP, Pohjanjoki P, Zyryanov AB, Lahti R. (2000). Fluoride effects along the reaction pathway of pyrophosphatase: evidence for a second enzyme-pyrophosphate intermediate. *Biochemistry*, **39**:11939-11947.
- Baykov AA, Malinen AM, Luoto HH, Lahti R. (2013). Pyrophosphate-fueled  $Na^{+}$  and  $H^{+}$  transport in prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **77**(2):267-76.
- Belogurov GA, Lahti R. (2002). A lysine substitute for  $K^{+}$ . *The Journal of Biological Chemistry*, **277**:49651-49654.
- Bernard M, Babior, MD. (2000). Phagocytes and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine*, **109**:33-44.
- Berthold DA, Stenmark P. (2003). Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**:497-517.
- Biagini GA, Bray PG, Spiller DG, White MR, Ward SA. (2003). The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular  $Ca^{2+}$  store. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 27910-27915.
- Bonansea S, Usorach M, Gesumaria MC, Santander V, Gimenez AM, Bollo M, Machado EE. (2012). Stress response to high osmolarity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **527**:6- 15.
- Bordier C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *Journal of Biological Chemistry*, **256**:1604-1607.
- Borrmann S, Szlezák N, Faucher JF, Matsiegui PB, Neubauer R, Binder RK, Lell B, Kremsner PG. (2001). Artesunate and praziquantel for the treatment of *Schistosoma haematobium* infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *The Journal of Infectious Diseases*, **184**:1363-1366.

- Boxma B, de Graaf RM, van der Staay GW, van Alen TA, Ricard G, Gabaldón T, van Hoek AH, Moon-van der Staay SY, Koopman WJ, van Hellemond JJ, Tielens AG, Friedrich T, Veenhuis M, Huynen MA, Hackstein JH. (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*, **434**:74-79.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2):248-254.
- Bray PG1, Ward SA, Ginsburg H. (1999). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, chloroquine uptake and drug resistance: inconsistencies in a newly proposed model. *Parasitology Today*, **9**:360-363.
- Brini M1, Carafoli E. (2011). The plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **1**:3-5.
- Brown S, Tuffery R. (2010). Induction of alternative oxidase activity in *Candida albicans* by oxidising conditions. *International Journal of Biological Sciences*, **6**:26-30.
- Brøderud AE, Poppe TT. (1986). Costiasis [*Ichthyobodo necator* infection] in farmed turbot (*Psetta maxima* L.). *Norsk Veterinærtidsskrift*, **98**:883- 884.
- Buchmann K. (2015). Impact and control of protozoan parasites in maricultured fishes. *Parasitology*, **142**:168–177.
- Budiño B, Lamas J, Pata MP, Arranz JA, Sanmartín ML, Leiro J. (2011). Intraspecific variability in several isolates of *Philasterides dicentrarchi* (syn. *Miamiensis avidus*), a scuticociliate parasite of farmed turbot. *Veterinary Parasitology*, **175**:260-272.
- Budiño B, Pata MP, Leiro J, Lamas J. (2012). Differences in the *in vitro* susceptibility to resveratrol and other chemical compounds among several *Philasterides dicentrarchi* isolates from turbot. *Parasitology Research*, **110**:1573-1578.
- Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Minge M, Skjaeveland A, Nikolaev SI, Jakobsen KS, Pawlowski J. (2007). Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS ONE*, **8**:790-796.
- Burlando B, Marchi B, Krüppel T, Orunesu M, Viarengo A. (1999). Occurrence of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in the ciliate *Euplotes crassus* and its role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Cell Calcium*, **25**:153-160.

- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **55**:611- 622.
- Byington CL, Dunbrack RL, Whitby FG, Cohen FE, Agabian N. (1997). *Entamoeba histolytica*: Computer-Assisted Modeling of Phosphofructokinase for the Prediction of Broad-Spectrum Antiparasitic Agents. *Experimental Parasitology*, **87**:194-202.
- Cabrera-Orefice A, Chiquete-Félix N, Espinasa-Jaramillo J, Rosas-Lemus M, Guerrero-Castillo S, Peña A, Uribe-Carvajal S. (2014). The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1837**:73-84.
- Caruso F, Mendoza L, Castro P, Cotoras M, Aguirre M, Maturhiro B, Isaacs M, Rossi M, Viglianti A, Antonioletti R. (2011). Antifungal Activity of Resveratrol against *Botrytis cinerea* Is Improved Using 2-Furyl Derivatives. *PLoS ONE*, **6**:25421-25431.
- Carystinos GD, McDonald HR, Monroy AF, Dhindsa RS, Poole RJ. (1995). Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiology*, **108**:641-649.
- Cavalier-Smith T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews*, **57**(4): 953-994.
- Chaudhuri M1, Hill GC. (1996). Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **83**(1):125-129.
- Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. (2006). *Trypanosome* alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology*, **22**:84–491.
- Chen J, Brevet A, Fromant M, Leveque F, Schmitter JM, Blanquet S, Plateau P. (1990). Pyrophosphatase Is Essential for Growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **172**(10):5686-5689.
- Chen Q, Vázquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. (2003). Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. Central role of complex III. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**:36027-36031.
- Chung K-T, Stevens SE, Lin W-F, Wei CI. (1993). Growth inhibition of related food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, **17**:29-32.



- Chung K-T, Lu Z, Chou MW. (1998). Mechanisms of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, **36**:1053-1060.
- Clarkson Jr AB, Bienen EJ, Pollakis G, Grady RW. (1989). Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **264**:17770–17776.
- Cooperman BS, Baykov AA, Lathi R. (1992). Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends in Biochemical Sciences*, **17**:262-266.
- Corliss JO: (1979). The ciliated Protozoa. 2nd Ed. Pergamon Press Ltd. France
- Costa, JH, Mota EF, Cambursano MV, Lauxman MA, Nogueira de Oliveira LM, Silva Lima MG, Orellano EG, Fernandes de Melo D. (2010). Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. *Journal of Plant Physiology*, **167**:561-570.
- Crespo MP, Avery TD, Hanssen E, Fox E, Robinson TV, Valente P, Taylor DK, Tilley L. (2008). Artemisinin and a series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*, **52**(1):98-109.
- Cuperus R, Leen R, Tytgat GA, Caron HN, van Kuilenburg AB. (2010). Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**:807-816
- Czarna M, Jarmuszkiewicz W. (2005). Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Letters*, **579**:3136–3140.
- Czarna M, Sluse FE, Jarmuszkiewicz W. (2007). Mitochondria function plasticity in *Acanthamoeba castellanii* during growth in batch culture. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **39**:149-157.
- Czarna M, Mathy G, MacCord A, Dobson R, Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Leprince P, De Pauw E, Sluse FE. (2010). Dynamics of the *Dictyostelium discoideum* mitochondrial proteome during vegetative growth starvation and early stages of development. *Proteomics*, **10**:6-22.
- Dauly C, Perlman DH, Costello CE, McComb ME (2006) Protein separation and characterization by np-RP-HPLC followed by intact MALDI-TOF mass spectrometry and peptide mass mapping analyses. *Journal of Proteome Research*, **5**:1688-1700.



- de Graaf RM, Ricard G, van Alen TA, Duarte I, Dutilh BE, Burgtorf C, Kuiper JW, van der Staay GW, Tielens AG, Huynen MA, Hackstein JH. (2011). The organellar genome and metabolic potential of the hydrogen-producing mitochondrion of *Nyctotherus ovalis*. *Molecular Biology and Evolution*, **28**(8):2379-91.
- de Souza W, Attias M, Rodrigues JC.(2009). Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **41**(10):2069- 2080.
- di Cicco E, Paradis E, Stephen C, Turba ME, Rossi G. (2013). Scuticociliatid ciliate outbreak in Australian potbellied seahorse, *Hippocampus abdominalis* (Lesson, 1827): clinical signs, histopathologic findings, and treatment with metronidazole. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **44**(2):435-440.
- Dickerson HW, Clark TG. (1996). Immune response of fishes to ciliates. *Annual Review of Fish Diseases*, **6**:107-120.
- Dietz I, Jerchel S, Szaszák M, Shima K, Rupp J. (2012). When oxygen runs short: the microenvironment drives host-pathogen interactions. *Microbes and infection*, **14**: 311-316.
- Docampo R. (1995). Antioxidant mechanisms (Cap. 9) en *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, Marr J, Müller M (1ª Ed) Academic Press, Massachusetts.
- Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SNJ. (1995). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, **15**;310:1005-1012.
- Docampo R, Moreno SN. (1999). Acidocalcisome: a novel  $\text{Ca}^{+2}$  storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitology Today*, **15**:443-448.
- Docampo R, Moreno SN. (2001a). The acidocalcisome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **114**:151-159.
- Docampo R, Moreno SN. (2001b). Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. *Current Drug Targets and Infectious Disorders*. **1**(1):51-61.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, **3**:251-61.

- Docampo R, Moreno SN. (2008). The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Current Pharmaceutical Design*, **14**:882-888.
- Docampo R, Ulrich P, Moreno SNJ. (2010). Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **365**:775-784.
- Docampo R, Moreno S. (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium*, **50**(2):113-119.
- Docampo R, Jimenez V, Lander N, Li ZH, Niyogi S. (2013). New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. *International Review of Cell and Molecular Biology*, **305**:69-113.
- Docampo R, Moreno SN, Plattner H. (2014). Intracellular calcium channels in protozoa. *European Journal of Pharmacology*, **15**:739-4-18.
- Docampo R, Huang G. (2015). Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell Calcium*, **57**(3): 194-202.
- Domínguez B, Pardo BG, Noia M, Millán A, Gómez-Tato A, Martínez P, Leiro J, Lamas J. (2013). Microarray analysis of the inflammatory and immune responses in head kidney turbot leucocytes treated with resveratrol. *International Immunopharmacology*, **15**: 588-596
- Dragesco A., Dragesco J., Coste F., Gasc C., Romestand B., Raymond J., Bouix G. (1995). *Philasterides dicentrarchi*, n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *European Journal of Protistology*, **31**:327-340.
- Drozdowicz YM, Lu YP, Patel V, Fitz-Gibbon S, Miller JH, Rea PA. (1999). A thermostable vacuolar-type membrane pyrophosphatase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps. *FEBS Letters*, **460**:505-512.
- Drozdowicz YM, Kissinger JC, Rea PA. (2000). AVP2, a sequence-divergent, K<sup>+</sup>-insensitive H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **23**:353-362.
- Drozdowicz YM, Rea PA. (2001). Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends in Plant Science*, **6**:206-211.
- Drozdowicz YM, Shaw M, Nishi M, Striepen B, Liwinski HA, Roos DS, Rea PA. (2003). Isolation and characterization of TgVP1, a type I vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii*. The dynamics of its

- subcellular localization and the cellular effects of a diphosphonate inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:1075-1085.
- Duszenko M1, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, de Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano PS, Stoka V, Turk B, Michels PA. (2011). Autophagy in protists. *Autophagy*, **7**(2):127-158.
- Dyková I, Figueras A. (1994). Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histiophagous ciliate. *Diseases of Aquatic Organisms*, **18**:5-9.
- Dyková I, Figueras A, Novoa B. (1995). Amoebic gill infection of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitologica*, **42**(2):91-6.
- Dzekunov SM, Ursos LM, Roepe PD. (2000). Digestive vacuolar pH of intact intraerythrocytic *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Molecular Biochemistry and Parasitology*, **110**(1):107-24.
- Edwards SW, Lloyd D. (1978). Properties of Mitochondria Isolated from Cyanide-Sensitive and Cyanide-Stimulated Cultures of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochemical Journal*, **174**:203-211.
- Ekanem AP, Brisibe EA. (2010). Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. *Parasitology Research*, **106**(5):1135-1139.
- Eckstein-Ludwig U1, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **424**:957-61.
- EFSA Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2014). Scientific opinion on the re-evaluation of propyl gallate (E 310) as a food additive. *EFSA Journal*, **12**(4), 3642–3688.
- Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM, Tallon LJ, Delcher AL, Salzberg SL, Silva JC, Haas BJ, Majoros WH, Farzad M, Carlton JM, Smith RK Jr, Garg J, Pearlman RE, Karrer KM, Sun L, Manning G, Elde NC, Turkewitz AP, Asai DJ, Wilkes DE, Wang Y, Cai H, Collins K, Stewart BA, Lee SR, Wilamowska K, Weinberg Z, Ruzzo WL, Wloga D, Gaertig J, Frankel J, Tsao CC, Gorovsky MA, Keeling PJ, Waller RF, Patron NJ, Cherry JM, Stover NA, Krieger CJ, del Toro C, Ryder HF, Williamson SC, Barbeau RA, Hamilton EP, Orias E. (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biology*, **4**:e286.

- El-Khoury R, Dufour E, Rak M, Ramanantsoa N, Grandchamp N, Csaba Z, Duvillié B, Bénit P, Gallego J, Gressens P, Sarkis C, Jacobs HT, Rustin P. (2013). Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS Genetics*, **9**:e1003182.
- Emanuelsson O, von Heijne G, Schneider G. (2001). Analysis and prediction of mitochondrial targeting peptides. *Methods in Cellular Biology*, **65**:175-187.
- Embley TM, van der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Bell S, Foster PG. (2003). Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB Life*, **55**(7):387-95.
- Embley TM, Martin W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, **30**; 440(7084):623-30.
- Enriquez JA, Lenaz G. (2014). Coenzyme Q and the respiratory chain: coenzyme Q pool and mitochondrial supercomplexes. *Molecular Syndromology*, **5**(3-4):119-40.
- Evans DA, Brown RC. (1973). m-Chlorobenzhydroxyamic acid, an inhibitor of cyanide-insensitive respiration in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Protozoology*, **20**(1):157-60.
- Espiau B, Lemercier G, Ambit A, Bringaud F, Merlin G, Baltz T, Bakalara N. (2006). A soluble pyrophosphatase, a key enzyme for polyphosphate metabolism in *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(3):1516-23.
- Fang J, Beattie DS. (2003). Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **414**:294-302.
- Fenchel T. (1980). Suspension Feeding in Ciliated Protozoa: Feeding Rates and Their Ecological Significance. *Microbial Ecology*, **6**: 13-25.
- Fenchel T, Finlay BJ. (1983). Respiration Rates in Heterotrophic, Free-living Protozoa. *Microbial Ecology*, **9**:99-122.
- Fenchel T, Finlay JB. (2008). Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **83**:553-869
- Fenchel T. (2012). Protozoa and Oxygen. *Acta Protozoologica*, **52**:11-20.
- Fenchel T. (2014). Respiration in heterotrophic unicellular eukaryotic organisms. *Protist*, **165**(4):485-492.
- Fernández-Casal J, Rodríguez JL. (2008). Evolución del cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en los últimos 10 años (1998-2007). *X Foro dos*

- Recursos Mariños e Acuicultura das Rias Galegas, Santiago de Compostela*, págs. 171-176.
- Fiala I, Dyková I. (2003). Molecular characterization of Neoparamoeba strains isolated from gills of *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **55**: 11-16.
- Figueras A, Novoa B, Santarém M, Martínez E, Álvarez JM, Tranzo AE, Dyková I. (1992). *Tetramicra brevifilum*, a potential threat to farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **14**:127-135.
- Finlay, BJ, Esteban GF, Fenchel T. (1998). Protist Protozoan Diversity: Converging Estimates of the Global Number of Free-Living Ciliate Species. *Protist*, **149**:29-37.
- Fonseca-de-Souza AL, Freitas-Mesquita AL, Vieira LP, Majerowicz D, Daflon-Yunes N, y col. (2014). Identification and Characterization of an Ectopyrophosphatase Activity in Intact Epimastigotes of *Trypanosoma rangeli*. *PLoS ONE*, **9**(9):e106852.
- Freitas-Mesquita AL, Fonseca-de-Souza AL, Meyer-Fernandes JR. (2014). *Leishmania amazonensis*: Characterization of an ecto-pyrophosphatase activity. *Experimental Parasitology*, **137**:8-13.
- Fujita K-I., Kubo I. (2002). Antifungal activity of octyl gallate. *International Journal of Food Microbiology*, **79**:193-201.
- Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y. (2004). Effect of salt and osmotic stresses on the expression of gene for the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase, H<sup>+</sup>-ATPase subunit A, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley. *Journal of Experimental Botany*, **55**:585-594.
- Gabaldón T. (2010). Peroxisome diversity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **365**:765-773.
- Gajadeera CS, Zhang X, Wei Y, Tsodikov OV. (2015). Structure of inorganic pyrophosphatase from *Staphylococcus aureus* reveals conformational flexibility of the active site. *Journal of Structural Biology*, **189**:81-86.
- Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM y col. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, **22**(1):58-73.
- Gao F, Fan X, Yi Z, Strüder-Kypke M, Song W. (2010). Phylogenetic consideration of two scuticociliate genera, *Philasterides* and *Boveria* (Protozoa, Ciliophora) based on 18S rRNA gene sequences. *Parasitology International*, **59**:549-555.



- Gao F, Katz LA, Song W. (2012). Insights into the phylogenetic and taxonomy of philasterid ciliates (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia) based on analyses of multiple molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**:308-317.
- Garrido, J, Garrido EM, Borges F. (2012). Studies on the food additive propyl gallate: synthesis, structural characterization, and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Chemical Education*, **89**:130-133.
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen G, Alper SL and Fink GR. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**:11444-11449.
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, **581**:2204-2214.
- Genestra M. (2007). Oxyl radicals, redox sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signaling*, **19**(9):1807-1819.
- Ginger ML, Fritz-Laylin LK, Fulton C, Cande WZ, Dawson SC. (2010). Intermediary metabolism in protists: a sequence-based view of facultative anaerobic metabolism in evolutionarily diverse eukaryotes. *Protist*, **161**(5):642-71.
- Ginger ML. (2006). Niche metabolism in parasitic protozoa. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **361**:101-118.
- Giri BR, Roy B. (2014). Resveratrol induced structural and biochemical alterations in the tegument of *Raillietina echinobothrida*. *Parasitology International*, **63**(2):432-427.
- Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. (2006). Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *International Journal for Parasitology*, **36**: 1427–144.
- Gómez –Saladín E, Small EB. (1993a). Starvation Induces Tomitogenesis in *Miamiensis avidus* Strain Ma/2'. *Journal of Eukariotic Microbiology*, **40**(6):727-730
- Gómez –Saladín E, Small EB. (1993b). Oral Morphogenesis of the Microstome to Macrostome Transformation in *Miamiensis avidus* Strain Ma/2'. *Journal of Eukariotic Microbiology* **40**(3):363-370.
- Gómez –Saladín E, Small EB. (1993c). Prey-induced Transformation of *Miamiensis avidus* Strain Ma/2 by a Soluble Factor. *Journal of Eukariotic Microbiology* **40**(5):550-556.

- Gordon-Weeks R, Steele SH, Leigh RA. (1996). The Role of Magnesium, Pyrophosphate, and Their Complexes as Substrates and Activators of the Vacuolar H<sup>+</sup>-Pumping Inorganic Pyrophosphatase (Studies Using Ligand Protection from Covalent Inhibitors). *Plant Physiology*, **111**(1): 195–202.
- Gordon-Weeks R, Parmar S, Davies TG, Leigh RA. (1999). Structural aspects of the effectiveness of bisphosphonates as competitive inhibitors of the plant vacuolar proton-pumping pyrophosphatase. *Biochemical Journal*, **337**:373–377.
- Goyal A, Tolbert NE. (1989). Variations in the alternative oxidase in *Chlamydomonas* grown in air or high CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, **89**:958–962.
- Grady RW, Bienen EJ, Dieck HA, Saric M, Clarkson Jr AB. (1993). N-n-alkyl-3,4-dihydroxybenzamides as inhibitors of the trypanosome alternative oxidase: activity *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 1082–1085.
- Gupta KJ, Zabalza A, van Dongen JT. (2009). Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia Plantarum*, **137**(4):383–391.
- Gutteridge JM, Halliwell B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **393**(4):561–564.
- Hackstein JHP, Tjaden J, Huynen M. (2006). Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: products of evolutionary tinkering! *Current Genetics*, **50**:225–245.
- Hamishehkar H, Khani S, Kashanian S, Dolatabadi JEN y Eskandani M. (2014). Geno- and cytotoxicity of propyl gallate food additive. *Drug and Chemical Toxicology*, **37**(3): 241–246.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. (2001a) Does the redox status of cytochrome C act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Radical Biology & Medicine*, **31**(5):697–703.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. (2001b). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, **29**(Pt 2):345–350.
- Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora JP, Rigden DJ, Michels PAM, Opperdoes FR. (2003). Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **100**(3):1067–1071.
- Harikrishnan R1, Jin CN, Kim MC, Kim JS, Balasundaram C, Heo MS. (2010a). Effectiveness and immunomodulation of chemotherapeutants against



- scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* in olive flounder. *Experimental Parasitology*, **124**(3):306-314.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. (2010b). Scuticociliatosis and its recent prophylactic measures in aquaculture with special reference to South Korea taxonomy, diversity and diagnosis of scuticociliatosis. Part I. Control strategies of scuticociliatosis: Part II. *Fish and Shellfish Immunology*, **29**:15-31.
- Harikrishnan R, Kim JS, Balasundaram C, Heo MS. (2012a). Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. *Experimental Parasitology*, **131**(1):116-124.
- Harikrishnan R, Jin CN, Kim JS, Balasundaram C, Heo MS. (2012b). *Philasterides dicentrarchi*, a histophagous ciliate causing scuticociliatosis in olive flounder, *Philasterides dicentrarchi* histopathology investigations. *Experimental Parasitology*, **130**(3):239-45.
- Harper JM, Huynh MH, Coppens I, Parussini F, Moreno S, Carruthers VB. (2006). A cleavable propeptide influences Toxoplasma infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Molecular Biology of the Cell*, **17**:4551-4563.
- Harris JC, Plummer S, Turner MP, Lloyd D. (2000). The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti giardial. *Microbiology*, **12**:3119-3127.
- Hart JH. (1981). Role of phytostilbenes in decay and disease resistant. *Annual Review of Phytopathology*, **19**: 437-458.
- Hauser K, Pavlovic N, Kissmehl R, Plattner H. (1998). Molecular characterization of a sarco(endo)plasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase gene from *Paramecium tetraurelia* and localization of its gene product to sub-plasmalemmal calcium stores. *Biochemical Journal*, **334**(Pt 1):31-38.
- Haynes CM, Ron D. (2010). The mitochondrial UPR-protecting organelle protein homeostasis. *Journal of Cell Science*, **123**:3849-3855.
- Hayward BH, Droste R, Epstein SS. (2003). Interstitial ciliates: benthic microaerophiles or planktonic anaerobes? *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**:356-359.
- Hedley C, Huntington T. (2009). Restricciones legales y reglamentarias de la acuicultura europea. Dirección General de Políticas internas de la Unión. Departamento temático B: Políticas estatales y de cohesión. Pesca. Parlamento Europeo. B-1047, Bruselas. Pág. 103.

- Hedlund J, Cantoni R, Baltscheffsky M, Baltscheffsky H, Persson B. (2006). Analysis of ancient sequence motifs in the H<sup>+</sup>-PPase family. *FEBS Journal*, **273**:5183-5193.
- Henríquez FL, Richards TA, Roberts F, McLeod R, Roberts CW. (2005). The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. *TRENDS in Parasitology*, **21**(2).
- Henríquez FL, McBride J, Campbell SJ, Ramos T, Ingram PR, Roberts F, Tinney S, Roberts CW. (2009). *Acanthamoeba* alternative oxidase genes: identification, characterisation and potential as antimicrobial targets. *International Journal of Parasitology*, **39**: 1417–2142.
- Henry M-F, Nyns E-J. (1975). Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. *Sub-Cellular Biochemistry*, **4**:1-65.
- Herrerías-Gutiérrez JM, Díaz Belmont A, Jiménez Sáenz M. (1996). Cap. 5 Los radicales libres y el estrés oxidativo. *Tratado de hepatología. Radicales libres y hepatología. Mecanismos naturales de protección*. Tomo I. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Hill JE, Scott DA, Luo S, Docampo R. (2000). Cloning and functional expression of a gene encoding a vacuolar-type proton-translocating pyrophosphatase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, **351**:281-288.
- Hirono M, Mimura H, Nakanishi Y, Maeshima M. (2005). Expression of functional *Streptomyces coelicolor* H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and characterization of its molecular properties. *Journal of Biochemistry*, **138**:183-191.
- Hochachka PW, Kutz PL, Suck TJ, Rosenthal M., van den Thillart G. (1993). Volume Overview: hypoxia defense and adaptational strategies (Cap. 1) en *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and adaptation*. Peter W. Hochachka, Peter L. Lutz, Thomas J. Sick, Myron Rosenthal. CRC Press, Londres.
- Holm NG, Baltscheffsky H. (2011). Links between hydrothermal environments, pyrophosphate, Na<sup>+</sup>, and early evolution. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, **41**:483–493.
- Hsu F-L, Chen P-S, Chang H-T, Chang S-T. (2009). Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**:543-547.
- Hu X. (2014). Ciliates in extreme environments. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **61**:410-418.

- Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Fernández J, Sanmartín ML. (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, **46**:47–55.
- Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Sanmartín ML. (2002). Antiprotozoals effective *in vitro* against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **49**:191-197.
- Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Aja C, Sanmartín ML. (2003a). *In vitro* growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Veterinary Parasitology*, **111**:19-30.
- Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Ubeira FM, Sanmartín ML. (2003b). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology*, **126**: 125-134.
- Inoue K, Tsurumi T, Ishii H, Park P, Ikeda K. (2012). Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*, **326**: 83-90.
- Isaksen TE, Karlsbakk E, Repstad O, Nylund A. (2012). Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (Kinetoplastida), important fish parasites. *Parasitology International*, **61**(4):675-83.
- Islam MK, Miyoshi T, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Arakawa T, Matsumoto Y, Tsuji N.(2003). Inorganic pyrophosphatase in the roundworm *Ascaris* and its role in the development and molting process of the larval stage parasites. *European Journal of Biochemistry*, **270**(13): 2814-26.
- Islam MK, Miyoshi T, Yamada M, Tsuji N. (2005). Pyrophosphatase of the roundworm *Ascaris suum* plays an essential role in the worm's molting and development. *Infection and Immunity*, **73**:1995-2004.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, **153**:163-168.
- Janes HW, Wiest SC. (1982). Inhibition of O<sub>2</sub> consumption resistant to cyanide and its development by N-propyl gallate and salicylhydroxamic acid. *Plant Physiology*, **70**:853–857.
- Jarmuskiewicz W, Wagner AM, Wagner MJ, Hryniewiecka L. (1997). Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Letters*, **411**:110-114.

- Jarmuskiewicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka I, Michejda J, Sluse FE. (1998). Electron partitioning between the two branching quinol-oxidizing pathways in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria during steady-state state 3 respiration. *Journal of Biological Chemistry*, **273**:10174-10180.
- Jarmuskiewicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka L, Sluse FE. (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Biological Chemistry*. **274**:23198-23202.
- Jarmuskiewicz W. (2001a). Uncoupling proteins in mitochondria of plants and some microorganisms. *Acta Biochimica Polonica*, **48**:145-155.
- Jarmuskiewicz W, Fraczyk O, Hryniewiecka L. (2001b). Effect of growth at low temperature on the alternative pathway respiration in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *Acta Biochimica Polonica*, **48**(3):729-737.
- Jarmuskiewicz W, Behrendt M, Navet R, Sluse FE. (2002). Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. *FEBS Letters*, **532**: 459-464.
- Jarmuskiewicz W, Woyda-Ploszczyca A, Antos-Kreminska N, Sluse FE. (2011). Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1797**:792-799.
- Jee BY, Kim KH, Park SH, Kim YC. (2000). A new strain of *Cryptocaryon irritans* from the cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **43**:211-215.
- Jee BY, Kim YC, Park MS. (2001). Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **47**:49-55.
- Jeter CR, Roux SJ. (2006). Plant responses to extracellular nucleotides: Cellular processes and biological effect. *Purinergic signaling*, **2**(3):443-449.
- Jin CN, Harikrishnan R, Moon YG, Kim MC, Kim JS, Balasundaram C, Azad IS, Heo MS. (2009). Histopathological changes of Korea cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* due to scuticociliatosis caused by histophagous scuticociliate, *Philasterides dicentrarchi*. *Veterinary Parasitology*, **12**:161(3-4):292-301.
- Jin CN, Harikrishnan R, Moon YC, Kim MC, Kim JS, Balasundaram C, Heo MS. (2010). Effectiveness of chemotherapeutants against scuticociliate *Philasterides dicentrarchi*, a parasite of olive flounder. *Veterinary Parasitology*, **168**:19-24.

- Jordan HV, Bowler AE, Berger ND. (1961). Testing of antioxidants against experimental caries in rats. *Journal of Dental Research*, **40**:878-883.
- Joshi DC, Bakowska JC. (2011). Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *Journal of Visualized Experiments*, **23**:2704.
- Jovel IT, Ferreira PE, Veiga MI, Malmberg M, Mårtensson A, Kaneko A, Zakeri S, Murillo C, Nosten F, Björkman A, Ursing J. (2014). Single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum* V type H<sup>+</sup> pyrophosphatase gene (pfvp2) and their associations with pfert and pfmdr1 polymorphisms. *Journal of Infection, Genetics and Evolution*, **24**:111–115.
- Jung SJ, Kitamura S, Song JY, Joung IY, Oh MJ. (2005). Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**(2):159-62.
- Jung SJ, Kitamura S, Song JY, Oh MJ. (2007). *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **73**(3):227-234.
- Jung SJ, Im EY, Strüder-Kypke MC, Kitamura SI, Woo PTK. (2011). Small subunit ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene sequences of 21 strains of the parasitic scuticociliate *Miamiensis avidus* (Ciliophora, Scuticociliatia). *Parasitology Research*, **108**:1153-1161.
- Jung HJ, Kim SJ, Jeon WK, Kim BC, Ahn K, Kim K, Kim YM, Park EH, Lim CJ. (2011). Anti-inflammatory activity of n-propyl gallate through down-regulation of NF-κB and JNK pathways. *Inflammation*, **34**(5):352-361.
- Kadenbach B, Ramzan R, Vogt S. (2013). High efficiency versus maximal performance —The cause of oxidative stress in eukaryotes: A hypothesis. *Mitochondrion*, **13**:1-6.
- Kajander T, Kellosalo J, Goldman A. (2013). Review Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms. *FEBS Letters*, **587**(13):1863-1869.
- Kakkar P, Singh BK. (2007). Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **305**(1-2):235-253.
- Kaneshiro ES, Holz GG Jr, Dunham PB. (1969). Osmoregulation in a marine ciliate, *Miamiensis avidus*. II. Regulation of intracellular free amino acids. *The Biological Bulletin*, **137**(1):161-169.



- Karlsson J. (1975). Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochimica et Biophysica Acta*, **399**:356-363.
- Karpova OV, Kuzmin EV, Elthon TE, Newton KJ. (2002). Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants. *The Plant Cell*, **14**:3271-3284.
- Katz LA. (2001). Evolution of nuclear dualism in ciliates: a reanalysis in light of recent molecular data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**:1587-1592.
- Kearns A, Whelan J, Young S, Elthon TE, Day DA (1992). Tissue-specific expression of the alternative oxidase in soybean and siratro. *Plant Physiology*, **99**:712-717.
- Kidder GW, Dewey VC. (1951). The biochemistry of ciliates in pure culture. *Biochemistry and Physiology of Protozoa I*: 323-400.
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, **37**, D387-D392.
- Kim Y, Kim EJ, Rea PA. (1994). Isolation and characterization of cDNAs encoding the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, **106**: 375-382.
- Kim SM, Cho JB, Kim SK, Nam YK, Kim KH. (2004). Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**:233-238.
- Kim WS, Choi WJ, Lee S, Kim WJ, Lee DC, Sohn UD, Shin HS, Kim W. (2015). Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, **19**(1):21-7.
- Kirimura K, Ogawa S, Hattori T, Kino K. (2006). Expression analysis of alternative oxidase gene (aox1) with enhanced green fluorescent protein as marker in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102**(3):210-4.
- Kissmehl R, Huber S, Kottwitz B, Hauser K, Plattner H. (1998). Subplasmalemmal Ca-stores in *Paramecium tetraurelia*. Identification and characterisation of a sarco(endo)plasmic reticulum-like Ca<sup>2+</sup>-ATPase by phosphoenzyme intermediate formation and its inhibition by caffeine. *Cell Calcium*, **24**(3):193-203.

- Kita K, Nihei C, Tomitsuka E. (2003). Parasite mitochondria as drug target: diversity and dynamic changes during the life cycle. *Current Medicinal Chemistry*, **10**(23):2535-48.
- Klonis N, Crespo-Ortiz MP, Bottova I, Abu-Bakar N, Kenny S, et al. (2011). Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **108**: 11405–11410.
- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. **7**;275(5305):1485-1489.
- Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, y col. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants and Redox Signaling*, **12**:1431–1470.
- Kotsikorou E, Song Y, Chan JM, Faelens S, Tovian Z, Broderick E, Bakalara N, Docampo R, Oldfield E. (2005). Bisphosphonate inhibition of the exopolyphosphatase activity of the *Trypanosoma brucei* soluble vacuolar pyrophosphatase. *Journal of Medical Chemistry*, **48**:6128-39.
- Kornberg A. (1962). On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions en Horizonts in Biochemistry. Kasha, M. & Pullman, B, eds., (251-264). Academic Press, New York.
- Kramhøft B, Jessen F. (1992). Acid extrusión by the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*, and activation of a quiescent  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger by  $\text{CuSO}_4$ . *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2**:8-17.
- Krungkrai SR, Yuthavong Y. (1987). The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**: 710–714.
- Kubo I, Xiao P, Fujita K-I. (2001). Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. *Bioinorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **11**:347-350.
- Kubo I, Fujita K, Nihei K. (2002). Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**:6692-6696.
- Kurz S, Tiedtke A. (1993). The Golgi apparatus of *Tetrahymena thermophile*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **40**(1):10-13.



- Kushnareva YE, Sokolove PM. (2000). Prooxidants open both the mitochondrial permeability transition pore and a low-conductance channel in the inner mitochondrial membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **376**:377-388.
- Kutik S, Guiard B, Meyer HE, Wiedemann N, Pfanner N. (2007). Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import. *The Journal of Cell Biology*, **179**:585-591.
- Ladenburger EM, Sehring IM, Korn I, Plattner H. (2009). Novel types of  $\text{Ca}^{2+}$  release channels participate in the secretory cycle of *Paramecium* cells. *Molecular and Cellular Biology*, **29**(13):3605-3622.
- Lahti R, Lönnberg H. (1985). Comparative kinetic studies on the two interconvertible forms of *Streptococcus faecalis* inorganic pyrophosphatase. *Biochemical Journal*, **231**:485-488.
- Lamas J, Morais P, Arranz JA, Sanmartín ML, Orallo F, Leiro J. (2009). Resveratrol promotes an inhibitory effect on the turbot scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* by mechanisms related to cellular detoxification. *Veterinary Parasitology*, **161**:307-315.
- Lambowitz AM, Sabourin JR, Bertrand H, Nickels R, McIntosh L. (1989). Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Molecular Cell Biology*, **9**:1362-1364.
- Lassmann T, Frings O, Sonnhammer EL. (2009). Kalign2:high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic Acids Research*, **37**:858-65.
- Lehninger A, Nelson DL, Cox MM. (2014). Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation Oxidative Phosphorylation (Cap 19) en Lehninger principles of biochemistry (6ª ed.) W.H. Freeman, New York.
- Leigh RA, Pope AJ, Jennings IR, Sanders D. (1992). Kinetics of the Vacuolar H-Pyrophosphatase: The Roles of Magnesium, Pyrophosphate, and their Complexes as Substrates, Activators, and Inhibitors. *Plant Physiology*, **100**(4):1698-1705.
- Leiro J, Siso MI, Paramá A, Ubeira FM, Sanmartín ML. (1999). DNA probes for detection of the fish microsporidians *Microgemma caulleryi* and *Tetramicra brevifilum*. *Parasitology*, **119**(Pt 6): 267-72.
- Leiro J, Iglesias R, Paramá A, Sanmartín ML, Ubeira FM. (2001). Effect of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection on respiratory-burst responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, **11**:639-652.

- Leiro J., Siso, M.I.G., Iglesias, R., Ubeira, F.M., Sanmartín, M.L. (2002). Mouse antibody response to a microsporidian parasite following inoculation with a gene coding for parasite ribosomal RNA. *Vaccine*, **20**:2648-2655.
- Leiro J, Arranz JA, Iglesias R, Ubeira FM, Sanmartín ML. (2004a). Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. *Fish & Shellfish Immunology*, **17**:27e39.
- Leiro J, Arranz JA, Parama A, Alvarez MF, Sanmartin ML. (2004b). *In vitro* effects of the polyphenols resveratrol, mangiferin and (-)- epigallocatechin-3-gallate on the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **59**:171-174.
- Leiro J, Piazzón MC, Budiño B, Sanmartín ML y Lamas J. (2008). Complement-mediated killing of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora) by turbot serum: relative importance of alternative and classical pathways. *Parasite Immunology*, **30**:535-543.
- Lemercier G, Dutoya S, Luo S, Ruiz FA, Rodrigues CO, Baltz T, Docampo R, Bakalara N. (2002). A vacuolar-type H<sup>+</sup> pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(40):37369-37376.
- Lenaz G. (2012). Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **942**:93-136.
- León-Rodríguez L, Luzardo-Álvarez A, Blanco-Méndez J, Lamas J, Leiro J. (2013). Biodegradable microparticles covalently linked to surface antigens of the scuticociliate parasite *P. dicentrarchi* promote innate immune responses *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, **34**(1):236-243.
- Lerchl J, König S, Zrenner R, Sonnewald U. (1995). Molecular cloning, characterization and expression of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. *Plant Molecular Biology*, **28**:833-840.
- Li L, Song W, Warren A, Wang Y, Ma H, Hu X, Chen Z. (2006). Phylogenetic position of the marine ciliate, *Cardiostomatella vermiforme* (Kahl, 1928) Corliss, 1960 inferred from the complete SSrRNA gene sequence, with establishment of a new order Loxocephalida n. ord. (Ciliophora, Oligohymenophorea). *European Journal of Protistology*, **42**(2):107-114.
- Li FJ, He CY. (2014). Acidocalcisome is required for autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Autophagy*, **10**(11):1978-1988.

- Liu Q, Zhang Q, Burton RA, Shirley NJ, Atwell BJ. (2010). Expression of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (OVP3) is under control of an anoxia-inducible promoter in rice. *Plant Molecular Biology*, **72**(1-2):47-60.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Delta Delta Ct method. *Methods*, **25**:402-408.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL. (2000). Electron Transport and Oxidative Phosphorylation Sección 16.2 en *Molecular Cell Biology*. (4<sup>a</sup> ed.) W.H. Freeman, New York.
- Lom J, Dyková I. (1992). Phylum Ciliophora, Doflein, 1901 (Cap. 8) en *Protozoan parasites of fishes*. Elsevier, Ámsterdam.
- Lom J, Dyková I. (2005). *Microsporidian xenomas* in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitologica (Praha)*, **52**(1-2):69-81.
- Long AR, Williams LE, Nelson SJ, Hall JL. (1995). Localization of membrane pyrophosphatase activity in *Ricinus communis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **146**:629-638.
- López ML, Segura Latorre C. (2008). The New Permeability Pathways And Cytosolic pH: Targets For Antimalarial Agents On *Plasmodium falciparum*. *Acta biologica Colombiana*, **13**(2).
- López-López O, Fuciños P, Pastrana L, Rúa ML, Cerdán ME, González-Siso MI. (2010). Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, **145**:226-232.
- López-Marqués RL, Pérez-Castiñeira JR, Losada M, Serrano A. (2004). Differential regulation of soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* provides insights into pyrophosphate-based stress bioenergetics. *Journal of Bacteriology*, **186**(16):5418-5426.
- Lourido S, Moreno SN. (2015). The calcium signaling toolkit of the Apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium spp.* *Cell Calcium*, **57**(3):186-193.
- Lundin M, Baltscheffsky H, Ronne H. (1991). Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(19):12168-12172.
- Luo S, Marchesini N, Moreno SN, Docampo R. (1999). A plant-like vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Letters*, **460**:217-220.

- Luo S, Vieira M, Graves J, Zhong L, Moreno SN. (2001). A plasma membrane-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase co-localizes with a vacuolar  $\text{H}^{+}$ -pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. *The EMBO Journal*, **20**(1-2):55-64.
- Luoto H, Belogurov GA, Baykov AA, Lahti R, Malinen AM. (2011).  $\text{Na}^{+}$ -translocating membrane pyrophosphatases are widespread in the microbial world and evolutionarily preceded  $\text{H}^{+}$ -translocating pyrophosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, **286**:21633–21642.
- Luoto HH, Baykov AA, Lahti R, Malinen AM. (2013). Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{H}^{+}$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, **110**(4):1255-1260.
- Luoto HH, Nordbo E, Malinen AM, Baykov AA, Lahti R. (2015). Evolutionarily divergent,  $\text{Na}^{+}$ -regulated  $\text{H}^{+}$ -transporting membrane-bound pyrophosphatases. *Biochemical Journal*, **467**(2):281-291.
- Lynn, D.H., Corliss, J.O. (1991). Phylum Ciliophora Cap. 5, págs. 333-467. En *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Harrison, F.W., Corliss, J.O. (eds.), Alan R. Liss, Nueva York.
- Lynn, D.H., Small, E.B. (2000). Phylum Ciliophora págs. 371-676. En *An Illustrated Guide to the Protozoa*. J.J. Lee, P.C. Bradbury, and G.F. Leedale (eds.). Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas.
- Lynn DH, Strüder-Kypke M. (2005). Scuticociliate endosymbionts of echinoids (phylum Echinodermata): phylogenetic relationships among species in the genera *Entodiscus*, *Plagiopyliella*, *Thyrophylax*, and *Entorhipidium* (phylum Ciliophora). *Journal of Parasitology*, **91**(5):1190-1199.
- Maddy AH. (1976). A critical evaluation of the analysis of membrane proteins by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of dodecyl sulfate. *Journal of Theoretical Biology*, **62**:315-326.
- Maeshima N, Yoshida S. (1989). Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphate from mung bean. *Journal of Biological Chemistry*, **264**: 20068-20073.
- Maeshima M. (1991).  $\text{H}^{+}$ -translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by  $\text{Ca}^{2+}$ , stabilization by  $\text{Mg}^{2+}$  and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. *European Journal of Biochemistry*, **26**;196(1):11-17.
- Maeshima M. (2000). Vacuolar  $\text{H}^{+}$ -pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**:37-51.

- Maeshima M. (2001). Tonoplast Transporters: Organization and Function. *Annual Review of Plant Physiology*, **52**:469–97.
- Magnani T, Soriani FM, Martins VP, Nascimento AM, Tudella VG, Curti C, Uyemura SA. (2007). Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiology Letters*, **27**:230-238.
- Makiuchi T, Nozaki T. (2014). Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*, **100**:3-17.
- Mallo N, Lamas J, Leiro JM. (2013). Evidence of an alternative oxidase pathway for mitochondrial respiration in the scuticociliate *Philasterides dicentrarchi*. *Protist*, **164**: 824-836.
- Mallo N, Lamas J, Leiro JM. (2014). Alternative oxidase inhibitors as antiparasitic agents against scuticociliatosis. *Parasitology*, **141**(10):1311-1321.
- Mallo N, Lamas J, Piazzon C, Leiro JM. (2015). Presence of a plant-like proton-translocating pyrophosphatase in a scuticociliate parasite and its role as a possible drug target. *Parasitology*, **142**:449-462.
- Mandal D, Mukherjee T, Sarkar S, Majumdar S, Bhaduri A. (1997). The plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of *Leishmania donovani* is an extrusion pump for  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochemical Journal*, **322**:251-257.
- Marchesini N, Luo S, Rodrigues CO, Moreno SNJ, Docampo R. (2000). Acidocalcisomes and vacuolar  $\text{H}^{+}$ -pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochemical Journal*, **347**:243-253.
- Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Bryant SH. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research*, **41**:D348-352.
- Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Health HT, Bailey BN, Kendrick H, Yardley V, Caldera A, Lira R, Urbina JA, Moreno SN, Docampo R, Croft SL, Oldfield E. (2001). Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, **44**:909-916.
- Martin W. (2005). The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends in Microbiology*, **13**(10):457-459.



- Martindale JL, Holbrook NJ. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, **192**:1-15.
- Martínez R, Wang Y, Benaim G, Benchimol M, de Souza W, Scott DA, Docampo R. (2002). A proton pumping pyrophosphatase in the Golgi apparatus and plasma membrane vesicles of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **120**:205-13.
- Martínez González L. (2014). Guía visual de peces de Galicia. <http://www.espaciosub.es/wp-content/uploads/2014/06/140416ESPECIES.pdf>. Licencia Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0.
- Martínez-Higuera A, Salas-Casas A, Calixto-Gálvez M, Chávez-Munguía B, Pérez-Ishiwara DG, Ximénez C, Rodríguez MA. (2013). Identification of calcium-transporting ATPases of *Entamoeba histolytica* and cellular localization of the putative SERCA. *Experimental Parasitology*, **135**(1):79-86.
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **96**(14):8271-8276.
- McCalley AE, Kaja S, Payne AJ, Koulen P. (2014). Resveratrol and calcium signaling: molecular mechanisms and clinical relevance. *Molecules*, **19**:7327-7340.
- McDonald AE, Vanlerberghe G. (2004). Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB Life*, **56**:333-341.
- McDonald AE, Vanlerberghe GC. (2006). Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics Proteomics*, **1**(3):357-64.
- McDonald AE. (2009). Alternative oxidase: what information can protein sequence comparisons give us? *Physiologia Plantarum*, **137**: 328–341.
- McDonald A, Vanlerberghe GC, Staples JF. (2009). Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *The Journal of Experimental Biology*, **212**: 2627-2634.
- McIntosh L. (1994). Molecular Biology of the Alternative Oxidase. *Plant Physiology*, **105**:781-786.
- McIntosh MT, Vaidya AB. (2002). Vacuolar type H<sup>+</sup> pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa. *International Journal of Parasitology*, **32**: 1-14.

- McIntosh MT, Drozdowicz YM, Laroiya K, Rea PA, Vaidya AB. (2001). Two classes of plant-like vacuolar-type  $H^+$ -pyrophosphatases in malaria parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **114**:183-195.
- Míguez M, Reeve C, Wood PM, Hollomon DW. (2004). Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Management Science*, **60**:3-7.
- Milani G, Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Schreiber AZ, Vercesi AE, Sluse FE. (2001). Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Letters*, **508**:231-235.
- Minagawa N, Yoshimoto A. (1987). The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansuela anomala*. *Journal of Biochemistry*, **101**:1141-1146
- Mínguez L, Brulé N, Sohm B, Devin S, Giambérini L. (2013). Involvement of apoptosis in host-parasite interactions in the zebra mussel. *PLoS One*, **8**(6):e65822.
- Miracle MR, Vicente E, Pedrós-Alió C. (1992). Biological studies of Spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica*, **8**:59-77.
- Miranda K, Benchimol M, Docampo R, de Souza W. (2000). The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, **86**(5):373-384.
- Miranda K, Docampo R, Grillo O, Franzen A, Attias M, Vercesi A, Plattner H, Hentschel J, de Souza W. (2004). Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. *Histochemical Cell Biology*, **112**:407-418.
- Miranda K, de Souza W, Plattner H, Hentschel J, Kawazoe U, Fang J, Moreno SN. (2008). Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. *Experimental Parasitology*, **118**:2-9.
- Mishina YV1, Krishna S, Haynes RK, Meade JC. (2007). Artemisinins inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* *in vitro* growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**(5):1852-1854.
- Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K, Sato MH. (2001). Novel type *Arabidopsis thaliana*  $H^+$ -PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Letters*, **488**: 29-33.
- Mlejnek P. (2013). Cytokinin-induced cell death is associated with elevated expression of alternative oxidase in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, **250**(5):1195-1202.



- Mogi T, Kita K. (2010). Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. *Parasitology International*, **59**:305-312.
- Möller, H. & Anders, K. (1986). Diseases and parasites of Marine fishes. Verlag-Moller. Kiel, Alemania.
- Møller IM. (2001), Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**:561-591.
- Montalvetti A, Bailey BN, Martin MB, Severin GW, Oldfield E, Docampo R. (2001). Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 33930-33937.
- Montalvetti A, Fernández A, Sanders JM, Ghosh S, Van Brussel E, Oldfield E, Docampo R. (2003). Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. *In vitro* RNA interference and *in vivo* inhibition studies. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:17075-17083.
- Monzote L, Gille L. (2010). Mitochondria as a promising antiparasitic target. *Current Clinical Pharmacology*, **5**(1):55-60. Moore AL, Albury MS, Crichton PG, Affourtit C. (2002). Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in Plant Science*, **7**:478-481.
- Moore AL, Albury MS. (2008). Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites. *Biochemical Society Transactions*, **36**(Pt 5):1022-1026.
- Moore AL, Carré JE, Affourtit C, Albury MS, Crichton PG, Kita K, Heathcote P. (2008). Compelling EPR evidence that the alternative oxidase is a diiron carboxylate protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**:27-330.
- Morais P, Lamas J, Sanmartín ML, Orallo F, Leiro J. (2009). Resveratrol induces mitochondrial alterations, autophagy and a cryptobiosis-like state in scuticociliates. *Protist*, **160**: 552-564.
- Morais P, Piazzon C, Lamas J, Mallo N, Leiro JM. (2013). Effect of resveratrol on oxygen consumption by *Philasterides dicentrarchi*, a scuticociliate parasite of turbot. *Protist*, **164**:206-217.
- Moreno SNJ, Docampo R. (2003). Calcium regulation in protozoan parasites. *Current Opinion in Microbiology*, **6**(4):359-364.
- Moreno SNJ, Docampo R. (2009). The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **56**:208-213.

- Moreno SNJ, Ayong L, Pace DA. (2011). Calcium storage and function in apicomplexan parasites. *Essays in Biochemistry Volumes*, **51**:97-110.
- Moriyama Y, Hayashi M, Yatsushiro S, Yamamoto A. (2003). Vacuolar proton pumps in malaria parasite cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **35**:367-75.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cell Biology*, **20**:7146-7159.
- Motamayor JC, Mockaitis K, Schmutz J, Haiminen N, Livingstone D, Cornejo O, Findley SD, Zheng P, Utro F, Royaert S, Saski C, Jenkins J, Podicheti R, Zhao M, Scheffler BE, Stack JC, Feltus FA, Mustiga GM, Amores F, Phillips W, Marelli JP, May GD, Shapiro H, Ma J, Bustamante CD, Schnell RJ, Main D, Gilbert D, Parida L, Kuhn DN. (2013). The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biology*, **14**:r53.
- Moustafa EM, Tange N, Shimada A, Morita T. (2010). Experimental Scuticociliatosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Miamiensis avidus*: pathological study on the possible neural routes of invasion and dissemination of the scuticociliate inside the fish body. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, **72**(12):1557-63.
- Mouton A, Crosbie P, Cadoret K, Nowak B. (2014). First record of amoebic gill disease caused by *Neoparamoeba perurans* in South Africa. *Journal of Fish Diseases*, **37**(4):407-409.
- Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. (2003). Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, **19**:320–328.
- Müller M1, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu RY, an der Giezen M, Tielens AG, Martin WF. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76**(2):444-95.
- Munday BL, O'Donoghue PJ, Watts M, Rough K, Hawkesford T. (1997). Fatal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-caged, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **30**(1):17-25.
- Muqbil I, Beck FW, Bao B, Sarkar FH, Mohammad RM, Hadi SM, Azmi AS. (2012). Old wine in a new bottle: the Warburg effect and anticancer mechanisms of resveratrol. *Current Pharmaceutical Design*, **18**(12):1645-1654.

- Murphy AD, Doeller J, Hearn B, Lang-Unnasch N. (1997). *Plasmodium falciparum*: cyanide resistant oxygen consumption. *Experimental Parasitology*, **87**: 112-120.
- Murphy AD, Lang-Unnasch N. (1999). Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**:651-654.
- Murphy MP. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, **417**(1):1-13.
- Muth R, Manber U. (1996). Approximate multiple string search, págs. 75-86. En Hirschberg DS, Myers EW, editors. *Proceedings of the 7th Annual Symposium on Combinatorial Pattern Matching*. Springer, Berlín.
- Mwai L, Diriyé A, Masseno V, Muriithi S, Feltwell T, Musyoki J, Lemieux J, Feller A, Mair GR, Marsh K, Newbold C, Nzila A, Carret CK. (2012). Genome wide adaptations of *Plasmodium falciparum* in response to lumefantrine selective drug pressure. *PLoS One*, **7**(2):e31623.
- Myers EW, Miller W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Computer Applications in the Biosciences*, **4**:11-17.
- Nagamune K, Beatty WL, Sibley LD. (2007). Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukariotic Cell*, **6**(11):2147-56.
- Nakamura K, Fujioka S, Fukumoto S, Inoue N, Sakamoto K, Hirata H, Kido, Y, Yabu Y, Suzuki T, Watanabe Y, Saimoto H, Akiyama H, Kita K. (2010). *Trypanosome* alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. *Parasitology International*, **59**: 560-564.
- Nakanishi Y, Saijo T, Wada Y, Maeshima M. (2001). Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 7654-7660.
- Navet R, Jarmuszkiewicz W, Dovette P, Sluse-Goffrt CM, Sluse FE. (2004). Mitochondrial respiratory chain complex patterns from *Acanthamoeba castellanii* by BN-PAGE and evidence of protein-protein interactions between alternative oxidase and complex III. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **36**:471-479.
- Nesnidal MP, Helmkampf M, Bruchhaus I, El-Matbouli M, Hausdorf B. (2013). Agent of whirling disease meets orphan worm: phylogenomic analyses firmly place Myxozoa in Cnidaria. *PLoS One*, **8**(1):e54576.

- Neupert W, Herrmann JM. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, **76**:723-749.
- Nihei C, Fukai Y, Kita K. (2002). Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1587**:234-239.
- Nihei C, Fukai Y, Kawai K, Osanai A, Yabu Y, Suzuki T, Ohta N, Minagawa N, Nagai K, Kita K. (2003). Purification of active recombinant trypanosome alternative oxidase. *FEBS Letters*, **538**: 35–40.
- Nowak, B. F. (2012). *Neoparamoeba perurans* págs 1-18 en Fish Parasites – Pathobiology and Protection (ed. Woo, P. T. K. and Buchmann, K.). CAB International, Wallingford, UK.
- O'Brien, WE. (1976). A continuous spectrophotometric assay for argininosuccinate synthetase based on pyrophosphate formation. *Annals of Biochemistry*, **76**:423-30.
- Ott R., Chibale K, Anderson S, Chipeleme A, Chaudhuri M, Guerrah A, Colowick N, Hill GC. (2006). Novel inhibitors of the trypanosome alternative oxidase inhibit *Trypanosoma brucei* growth and respiration. *Acta Tropica*, **100**:172-184
- Ozkoc S, Tuncay S, Delibas SB, Akisu C. (2009). *In vitro* effects of resveratrol on *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, **105**(4):1139-1143.
- Pace DM, Belda WH. (1944). The effects of potassium cyanide, potassium arsenite and ethyl urethane on respiration in *Pelomyxa carolinensis*. *The Biological Bulletin*, **87**:138–149.
- Pace DA, Fang J, Cintron R, Docampo MD, Moreno SN. (2011). Overexpression of a cytosolic pyrophosphatase (TgPPase) reveals a regulatory role of PP(i) in glycolysis for *Toxoplasma gondii*. *Biochemical Journal*, **440**:229-240.
- Palenzuela O, Redondo MJ, Alvarez-Pellitero P. (2002). Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Journal of Parasitology*, **88**(3):482-428.
- Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A, Riaza A, Silva R, Arán J, Alvarez-Pellitero P. (2009). Antibody responses of turbot *Psetta maxima* against various antigen formulations of scuticociliates Ciliophora. *Diseases of Aquatic Organisms*, **86**(2):123-134.
- Pan YJ, Lee CH, Hsu SH, Huang YT, Lee CH, Liu TH, Chen YW, Lin SM, Pan RL. (2011). The transmembrane domain 6 of vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase

- mediates protein targeting and proton transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1807**: 59-67.
- Pan X, Yi Z, Li J, Ma H, Al-Farraj SA, Al-Rasheid KA. (2015). Biodiversity of marine scuticociliates (Protozoa, Ciliophora) from China: Description of seven morphotypes including a new species, *Philaster sinensis* spec. nov. *European Journal of Protistology*, **51**(2):142-157.
- Pana X, Bourlandb WA, Songa W. (2013). Protargol Synthesis: An In-house Protocol. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **60**:609–614.
- Paramá A, Iglesias R, Álvarez MF, Leiro J, Aja C, Sanmartín ML. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, **217**: 73–80.
- Paramá A, Iglesias R, Álvarez MF, Leiro J, Quintela JM, Peinador C, González L, Riguera R, Sanmartín ML. (2004). *In vitro* efficacy of new antiprotozoals against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**(1-2):97-102.
- Paramá A, Luzardo A, Blanco-Méndez J, Sanmartín ML, Leiro J. (2005). *In vitro* efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against the fish-pathogenic ciliate *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**(2):151-8.
- Paramá A, Arranz JA, Álvarez MF, Sanmartín ML, Leiro J. (2006). Ultrastructure and phylogeny of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatia) from farmed turbot in NW. *Parasitology*, **132**(Pt 4):555-564.
- Pardo BG, Fernández C, Millán A, Bouza C, Vázquez-López A, Vera M, Álvarez-Dios JA, Calaza M, Gómez-Tato A, Vázquez M, Cabaleiro S, Magariños B, Lemos ML, Leiro JM, Martínez P. (2008). Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC Veterinary Research*, **4**:37.
- Pardo BG, Millán A, Gómez-Tato A, Fernández C, Bouza C, Alvarez-Dios JA, Cabaleiro S, Lamas J, Leiro JM, Martínez P. (2012). Gene expression profiles of spleen, liver, and head kidney in turbot (*Scophthalmus maximus*) along the infection process with *Philasterides dicentrarchi* using an immune-enriched oligo-microarray. *Marine Biotechnology*, **14**(5):570-82.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, **46**:143–151.
- Parrish DJ, Leopold AC. (1978). Confounding of alternative respiration by lipoxxygenase activity. *Plant Physiology*, **62**:470-472.



- Patel S, Cai X. (2015). Evolution of acidic  $\text{Ca}^{2+}$  stores and their resident  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels. *Cell Calcium*, **57**(3):222-230.
- Pearse L. (1972). A note on a marine trichodinid ciliate parasitic on the skin of captive flatfish. *Aquaculture*, **1**:261-266.
- Pérez-Castiñeira JR, Gómez-García R, López-Marqués RL, Losada M, Serrano A. (2001a). Enzymatic systems of inorganic pyrophosphatase bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? *International Microbiology*, **4**:135-142.
- Pérez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Losada M, Serrano A. (2001b). A thermostable  $\text{K}^{+}$ -stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Letters*, **496**:6-11.
- Pérez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Villalba JM, Losada M, Serrano A. (2002a). Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant  $\text{H}^{+}$ -translocating pyrophosphatases. *Proceedings of National Academy of Science USA*, **99**:15914-15919.
- Pérez-Castiñeira JR, Alvar J, Ruiz-Pérez LM, Serrano A. (2002b). Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **294**(3):567-573.
- Petel G, Genraud M. (1989). Localization in sucrose gradients of pyrophosphatase activities in the microsomal fractions of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Journal of Plant Physiology*, **134**: 466-470.
- Peterman TK, Siedow JN. (1983). Structural features required for inhibition of soybean lipoxygenase-2 by propyl gallate. *Plant Physiology*, **71**: 55-58.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, **8**:785-786.
- Philimonenko VV, Janáček J, Hozák P. (2002). LR White is preferable to Unicryl for immunogold detection of fixation sensitive nuclear antigens. *European Journal of Histochemistry*, **46**: 359-364.
- Piazzón C, Lamas J, Castro R, Budiño B, Cabaleiro S, Sanmartín M, Leiro J. (2008). Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish and Shellfish Immunology*, **25**:417-424.
- Piazzón C, Lamas J, Leiro JM. (2011a). Role of scuticociliate proteinases in infection success in turbot, *Psetta maxima* (L.). *Parasite Immunology*, **33**:535-544.

- Piazzón MC, Wiegertjes GF, Leiro J, Lamas J. (2011b). Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on cellular immune responses. *Fish and Shellfish Immunology*, **30**(6):1339-13347.
- Piazzón, C., Mallo, N., Martín, I., Fernández-Casal, J., Sanmartín, M. L., Lamas, J., Leiro, J. M. (2012). Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Enteromyxum scophthalmi* parasites in turbot intestinal samples. *Aquaculture*; **366–367**:122–128.
- Piazzón MC, Leiro J, Lamas J. (2014). Reprint of "fish immunity to scuticociliate parasites". *Developmental & Comparative Immunology*, **43**(2):280-289.
- Pirola L, Fröjdö S. (2008). Resveratrol: One Molecule, Many Targets. *IUBMB Life*, **60**(5):323-332.
- Pittman JK. (2011). Vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. *Cell Calcium*, **50**:139-146.
- Plattner H, Klauke N. (2001). Calcium in Ciliated Protozoa: Sources, Regulation, and Calcium-Regulated Cell Functions. *International Review of Cytology*, **201**:115-208.
- Plattner H. (2010). Membrane trafficking in Protozoa: SNARE proteins,  $\text{H}^{+}$ -ATPase, actin, and others key players in ciliates. *International Review of Cell and Molecular Biology*, **280**: 79-184.
- Plattner H, Sehring IM, Mohamed IK, Miranda K, De Souza W, Billington R, Genazzani A, Ladenburger EM. (2012). Calcium signaling in closely related protozoan groups (Alveolata): non-parasitic ciliates (*Paramecium*, *Tetrahymena*) vs. parasitic Apicomplexa (*Plasmodium*, *Toxoplasma*). *Cell Calcium*, **51**:351-382.
- Plattner H. (2013). Calcium Regulation in the Protozoan Model *Paramecium tetraurelia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **61**:95–114.
- Plattner H. (2014). Calcium regulation in the protozoan model, *Paramecium tetraurelia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **61**(1):95-114.
- Plattner H. (2015a). Molecular aspects of calcium signalling at the crossroads of unikont and bikont eukaryote evolution – The ciliated protozoan *Paramecium* in focus. *Cell Calcium*, **57**:174–185.
- Plattner H. (2015b). Calcium signalling in the ciliated protozoan model, *Paramecium*: strict signal localisation by epigenetically controlled positioning of different  $\text{Ca}^{2+}$ -channels. *Cell Calcium*, **57**(3):203-213.



- Plaxton WC. (2009). A Web-Essay for 5th Edition of Taiz & Zeiger's *Plant Physiology*. En: *Universidad de Queens*: <http://post.queensu.ca/~plaxton/PDF/Plaxton-webessay-APRIL2009.pdf>
- Pohjanjoki P, Fabrichniy IP, Kasho VN, Cooperman BS, Goldman A, Baykov AA, Lahti R. (2001). Probing essential water in yeast pyrophosphatase by directed mutagenesis and fluoride inhibition measurements. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 434-441.
- Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA. (1997). Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria. *FEBS Letters*, **415**: 87-90.
- Popov VN, Purvis AC, Skulachev VP, Wagner AM. (2001). Stress-induced Changes in Ubiquinone Concentration and Alternative Oxidase in Plant Mitochondria. *Bioscience Reports*, **21**(3): 369-379.
- Popov VN. (2003). Possible role of free oxidation processes in the regulation of reactive oxygen species production in plant mitochondria. *Biochemical Society Transactions*, **31**(6): 1316-1317.
- Poulos MG, Batra R, Charizanis K, Swanson MS. (2011). Developments in RNA Splicing and Disease. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, **3**:a000778.
- Puig L, Traveset R, Palenzuela O, Padrós F. (2007). Histopathology of experimental scuticociliatosis in turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **76**(2):131-140.
- Purvis, A. C. and Shewfelt, R. L. (1993), Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum*, **88**: 712-718.
- Putignani L, Tait A, Smith HV, Horner D, Tovar J, Tetley L, Wastling JM. (2004). Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, **129**(1):1-18.
- Qi Y, Wang H, Zou Y, Liu C, Liu Y, Wang Y, Zhang W. (2011). Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Letters*, **585**: 231-239.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, López R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, **33**: W116-120.
- Quinlan CL, Treberg JR, Perevoshchikova IV, Orr AL, Brand MD. (2012). Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria

- measured using endogenous reporters. *Free Radical Biology and Medicine*, **53**(9):1807–1817.
- Quintela JM, Peinador C, González L, Iglesias R, Paramá A, Alvarez F, Sanmartín ML, Rigüera R. (2003). Piperazine N-substituted naphthyridines, pyridothienopyrimidines and pyridothienotriazines: new antiprotozoals active against *Philasterides dicentrarchi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **38**(3):265-275.
- Quiroga MI, Redondo MJ, Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Vázquez S, Perez A, Nieto JM, Alvarez-Pellitero P. (2006). Risk factors associated with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Parasitology*, **133**(Pt 4):433-442.
- Ramos MF, Costa AR, Barandela T, Saraiva A, Rodrigues PN. (2007). Scuticociliate infection and pathology in cultured turbot *Scophthalmus maximus* from the north of Portugal. *Diseases of Aquatic Organisms*, **74**:249–253.
- Rathore GS, Suthar M, Pareek A, Gupta RN. (2011). Nutritional antioxidants: A battle for better health. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, **2**:2-14.
- Raychaudhury B, Gupta S, Banerjee S, Datta SC. (2006). Peroxisome is a reservoir of intracellular calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1760**:989–992.
- Rea PA, Poole RJ. (1986). Chromatographic resolution of H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase from H<sup>+</sup>-translocating ATPase of higher plant tonoplast. *Plant Physiology*, **81**:126-129.
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM, Sanders D. (1992a). Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends in Biochemical Science*, **17**: 348-353.
- Rea PA, Britten CJ, Sarafian V. (1992b). Common identity of substrate binding subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase of higher plant cells. *Plant Physiology*, **100**:723-732.
- Rea PA, Poole RJ. (1993). Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **44**:157-180.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, 2002). Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Parasitology*, **88**: 482-488.
- Renaud F, Gabrion C, Romestand B. (1984). [The *Bothriocephalus scorpii* complex (Mueller, 1776). Differentiation of species of parasites of the turbot (*Psetta maxima*) and the brill (*Scophthalmus rhombus*). Study of protein fractions

- and antigen complexes]. *Annals of Parasitology Human Compared*, **59**(2):143-149.
- Reyes-Prieto A, Moustafa A, Bhattacharya D. (2008). Multiple genes of apparent algal origin suggest ciliates may once have been photosynthetic. *Current Biology*, **18**(13):956-962.
- Ribas-Carbo M, Berry JA, Azcon-Bieto J, Siedow JN. (1994). The reaction of the plant mitochondrial cyanide-resistant alternative oxidase with oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1188**:205–212.
- Roberts CW, Roberts F, Henriquez FL, Akiyoshi D, Samuel BU, Richards TA, Milhous W, Kyle D, McIntosh L, Hill GC, Chaudhuri M, Tzipori S, McLeod R. (2004). Evidence for mitochondrial derived alternative oxidase in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: a potential anti-microbial agent target. *International Journal of Parasitology*, **34**:297–308.
- Robinson DG, Haschke HP, Hinz G, Hoh B, Maeshima M, Marty F. (1996). Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons. *Plantae*, **198**: 95-103.
- Robinson JM. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochemistry Cell Biology*, **131**(4):465-9.
- Rocke E, Liu H. (2014). Respiration, growth and grazing rates of three ciliate species in hypoxic conditions. *Marine Pollution Bulletin*, **85**:410–417.
- Rodan GA. (1998). Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **38**: 375-388.
- Rodan GA, Fleisch HA. (1996). Bisphosphonates: mechanisms of action. *Journal of Clinical Investigation*, **97**(12):2692-26926.
- Rodgers LF, Markle KL, Hennessey TM. (2008). Responses of the Ciliates *Tetrahymena* and *Paramecium* to Vertebrate Odorants and Tastants. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55**(1):27-33.
- Rodgers CJ, Furones MD. (2011). Guía para la gestión sanitaria en acuicultura. Plan Nacional de Gestión Sanitaria de la Acuicultura (GESAC): Adaptación a la nueva normativa. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). Secretaría General del Mar. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. En: [http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/guia\\_gestion\\_sanitaria\\_acuicultura\\_tcm7-355806.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/guia_gestion_sanitaria_acuicultura_tcm7-355806.pdf)
- Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. (1999a). Presence of a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its

- localization to a different compartment from the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemical Journal*, **340**:759-766.
- Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. (1999b). Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. *Molecular and Cellular Biology*, **19**: 7712-7723.
- Rodrigues CO, Scott DA, BN, de Souza W, Benchimol M, Urbina JA, Oldfield E, Moreno. (2000). Vacuolar proton pyrophosphatase activity (PPi) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic target. *Biochemical Journal*, **349**, 737-745.
- Rodrigues CO, Ruiz FA, Rohloff P, Scott DA, Moreno SNJ. (2002). Characterization of Isolated Acidocalcisomes from *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Reveals a Novel Pool of Hydrolyzable Polyphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(50):48650–48656.
- Rodríguez-Ramilo ST, Fernández J, Toro MA, Bouza C, Hermida M, Fernández C, Pardo BG, Cabaleiro S, Martínez P. (2013). Uncovering QTL for resistance and survival time to *Philasterides dicentrarchi* in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Animal Genetics*, **44**(2):149-57.
- Rogers MJ, Watts DJ, Graham R, Russel G, Ji X, Xiong X, Blackburn GM, Bayless AV, Ebetin FH. (1994). Inhibitory Effects of Bisphosphonates on Growth of Amoebae of the Cellular Slime Mold *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Bone and Mineral Research*, **9**(7):1029-39.
- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*, **88**: 2961-78.
- Rogov AG, Sukhanova EI, Uralskaya LA, Aliverdieva DA, Zvyagil'skaya RA. (2015). Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry (Moscow)*, **79**(13):1615-34.
- Rohloff P, Rodrigues CO, Docampo R. (2003). *Regulatory volume decrease in Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **126**(2):219-30.
- Rohloff P, Docampo R. (2006). Ammonium production during hypo-osmotic stress leads to alkalization of acidocalcisomes and cytosolic acidification in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **150**:249–255.
- Rohloff P, Docampo R. (2008). A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, **118**(1):17–24.

- Rojas-Beltrán JA, Dubois F, Mortiaux F, Portetelle D, Gebhardt C, Sangwan RS, du Jardin P. (1999). Identification of cytosolic Mg<sup>2+</sup>-dependent soluble inorganic pyrophosphatases in potato and phylogenetic analysis. *Plant Molecular Biology*, **39**: 449–461.
- Rossteuscher S, Wenker C, Jermann T, Wahli T, Oldenberg E, Schmidt-Posthaus H. (2008). Severe scuticociliate (*Philasterides dicentrarchi*) infection in a population of sea dragons (*Phycodurus eques* and *Phyllopteryx taeniolatus*). *Veterinary Parasitology*, **45**(4):546-550.
- Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK. (2008). Mitochondria-Dependent Reactive Oxygen Species-Mediated Programmed Cell Death Induced by 3,3'-Diindolylmethane through Inhibition of F0F1-ATP Synthase in Unicellular Protozoan Parasite *Leishmania donovani*. *Molecular Pharmacology*, **74**(5):1292–1307.
- Rueda-González FM. (2011). Breve historia de una gran desconocida: La Acuicultura. *Eubacteria: Especial Biología Marina*, **26**(1):1-2.  
En:<http://www.um.es/eubacteria/acuicultura.pdf>
- Ruíz FA, Marchesini N, Seufferheld M, Govindjee, Docampo R. (2001). The Polyphosphate Bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* Possess a Proton-pumping Pyrophosphatase and Are Similar to Acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(49): 46196–46203.
- Rurek M, Woyda-Ploszczyca AM, Jarmuszkiewicz W. (2015). Biogenesis of mitochondria in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) curds subjected to temperature stress and recovery involves regulation of the complexome, respiratory chain activity, organellar translation and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1847**:399–417.
- Russell RG, Rogers MJ. (1999). Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*, **25**: 97-106.
- Ryan U. (2010). *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*, **124**(1):113-20.
- Sahoo N, Labruyère E, Bhattacharya S, Sen P, Guillén N, Bhattacharya A. (2004). Calcium binding protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. *Journal of Cellular Science*, **117**(Pt 16):3625-3634.
- Saitoh O, Murata Y, Odagiri M, Itoh M, Itoh H, Misaka T, Kubo Y. (2002). Alternative splicing of RGS8 gene determines inhibitory function of receptor type-specific Gq signaling. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, **99**:10138-10143.



- Saitou N, Nei M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4):406-425.
- Sakajo S, Minagawa N, Komiyama T, Yoshimoto A. (1991). Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1090**: 102-108.
- Sakajo S, Minagawa N, Yoshimoto A. (1997). Effect of nucleotides on cyanide-resistant respiratory activity in mitochondria isolated from antimycin A-treated yeast *Hansenula anomala*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **61**: 396-399.
- Sakakibara Y, Kobayashi H, Kasamo K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, **31**: 1029-1038.
- Saliba KJ, Allen RJ, Zissis S, Bray PG, Ward SA, Kirk K. (2003). Acidification of the malaria parasite's digestive vacuole by a H<sup>+</sup>-ATPase and a H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:5605-5612.
- Sanmartín Durán, M.L., Caamaño-García, F., Fernández Casal, J., Leiro, J. y Ubeira, F.M.(1989). Anthelmintic Activity of Praziquantel, Niclosamide, Netobimin and Mebendazole against *Bothriocephalus scorpii* Naturally Infecting Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, **76**: 199-201.
- Sanmartín Durán, M.L., Fernández Casal, J., Tojo, J.L., Santamarina, M.T., Estévez, J. y Ubeira, F. (1991). *Trichodina* sp: Effect on the Growth of farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **11**(2): 89-91.
- Sanmartín ML, Paramá A, Castro R, Cabaleiro S, Leiro J, Lamas J, Barja JL. (2008). Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Diseases*, **31**(2):135-140.
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA. (1992). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, **89**:1775-9.
- Saraiva A, Ramos MF, Barandela T, Sousa JA, Rodrigues PN. (2009). *Cryptosporidium* sp. (Apicomplexa) from cultured turbot *Psetta maxima*. *Bulletin Archive European Association of Fish Pathologists*, **29**(1):34.

- Saz HJ. (1981). Energy metabolisms of parasitic helminths: adaptations to parasitism. *Annual Review of Physiology*, **43**:323–341.
- Sbaghi M, Jeandet P, Bessis R, Leroux P. (1996). Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology*, **45**: 139–144.
- Schöcke L, Schink B. (1998). Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase of *Syntrophus gentianae*, a syntrophically benzoate-degrading fermenting bacterium. *European Journal of Biochemistry*, **256**: 589-594.
- Schonbaum GR, Bonner WD, Storey BT, Bahr JT. (1971). Specific Inhibition of the Cyanide insensitive Respiratory Pathway in Plant Mitochondria by Hydroxamic Acids. *Plant Physiology*, **47**, 124-128.
- Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R. (1998). Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 22151-22158.
- Scott DA, Docampo R. (2000). Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 24215-21.
- Seeber F, Limenitakis J, Soldati-Favre D. (2008). Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of gains, losses and retentions. *Trends in Parasitology*, **24**: 468-478.
- Segami S, Nakanishi Y, Sato MH, Maeshima M. (2010). Quantification, Organ-Specific Accumulation and Intracellular Localization of Type II H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **51**(8): 1350–1360.
- Sen SS, Bhuyan NR, Bera T. (2009). Characterization of plasma membrane bound inorganic pyrophosphatase from *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes. *African Health Sciences*, **9**:212-217.
- Serrano A, Pérez-Castiñeira R, Baltscheffsky H. (2004). Proton-pumping inorganic pyrophosphatases in some archaea and other extremophilic prokaryotes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **36**: 127-133.
- Serrano A, Pérez-Castiñeira JR, Baltscheffsky M, Baltscheffsky H. (2007). H<sup>+</sup>-PPases yesterday, today and tomorrow. *IUBMB Life*, **59**: 76-83.
- Seufferheld M, Lea CR, Vieira M, Oldfield E, Docampo R. (2004). The H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in



- polyphosphate-rich acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 51193-51202.
- Shandilya A, Chacko S, Jayaram B, Ghosh I. (2013). A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. *Scientific Reports* **3**: 2513.
- Shen HB, Chou KC. (2007). Signal-3L: a 3-layer approach for predicting signal peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **363**: 297-303.
- Shen XS, Su Q, Qiu ZP, Xu JY, Xie YX, Liu HF, Liu Y. (2010). Effects of Artemisinin Derivative on the Growth Metabolism of *Tetrahymena thermophila* BF5 Based on Expression of Thermokinetics. *Biological Trace Element Research*, **136**(1):117-25.
- Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto H, Moore AL, Harada S, Kita K. (2013). Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proceedings in National Acadademy of Science U S A*, **19**;110(12):4580-4585.
- Shin PS, Han JE, Gomez DK, Kim JH, Choresca Jr. CH, Jun JW, Park SC. (2011). Identification of scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* from indo-pacific seahorses *Hippocampus kuda*. *African Journal of Microbiology Research*, **5**(7):738-741.
- Shiomi K, Hatae K, Hatano H, Matsumoto A, Takahashi Y, Jiang CL, Tomoda H, Kobayashi S, Tanaka H, Omura S. (2005). A New Antibiotic, Antimycin A<sub>9</sub>, Produced by *Streptomyces* sp. K01-0031. *The Journal of Antibiotics*, **58**, 74-78.
- Siedow JN, Girvin ME. (1980). Alternative respiratory pathway. Its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiology*, **65**: 669-674.
- Sierra-Campos E, Valdez-Solana MA, Matuz-Mares D, Velázquez I, Pardo JP. (2009). Induction of morphological changes in *Ustilago maydis* cells by octyl gallate. *Microbiology*, **155**: 604-611.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using ClustalOmega. *Molecular Systems Biology*, **7**:539.

- Silva P, Gerós H. (2009). Regulation by salt of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase activities and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange. *Plant Signaling & Behavior*, **4**: 718-726.
- Sircar D, Cardoso HG, Mukherjee C, Mitra A, Arnholdt-Schmitt B. (2012). Alternative oxidase (AOX) and phenolic metabolism in methyl jasmonate-treated hairy root cultures of *Daucus carota* L. *Journal of Plant Physiology*, **169**(7):657-663.
- Sitaramam V, Pachapurkar S, Gokhale T. (2008). The alternative oxidase mediated respiration contributes to growth, resistance to hyperosmotic media and accumulation of secondary metabolites in three species. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **14**(3).
- Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Macias MA, Ferreira I, Ríaza A, Alvarez-Pellitero P. (2004). Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, **17**:335-345.
- Skutnik, M. y Rychter, A.M. (2009). Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 926-937.
- Sluse FE, Jarmuszkiewicz W. (1998). Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, **31**(6):733-747.
- Small EB. (1967). The Scuticociliatida, a New Order of the Class Ciliata (Phylum Protozoa, Subphylum Ciliophora). *Transactions of the American Microscopical Society* **86**(4).
- Small HJ1, Neil DM, Taylor AC, Bateman K, Coombs GH. (2005). A parasitic scuticociliate infection in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **90**(2):108-117.
- Smith P J, McVeagh S M, Hulston D, Anderson SA, Gublin Y. (2009). DNA identification of ciliates associated with disease outbreaks in a New Zealand marine fish hatchery. *Diseases of Aquatic Organisms*, **86**(2):163-167.
- Smurov AO, Podlipaeva IuI, Gudkov AV. (2007). [Heat shock protein of Hsp70 in *Paramecium nephridiatum* and its role in adaptation to environmental salinity changes]. *Tsitologiya*, **49**(4):292-295.
- Soares Medeiros LCA, Moraes Moreira BL, Miranda K, de Souza W, Plattner H, Hentschel J, Barrabin H. (2005). A proton pumping pyrophosphatase in

- acidocalcisomas of *Herpetomonas* sp. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **140**:175–182.
- Song JY, Kitamura SI, Oh MJ, Kang HS, Lee JH, Tanaka SJ, Jung SJ. (2009). Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **83**: 133–143.
- Sosa A, Ordaz H, Romero I, Celis H. (1992).  $Mg^{+2}$  is an essential activator of hydrolytic activity of membrane-bound pyrophosphate of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemical Journal*, **283**: 561-566.
- Spillman NJ, Allen RJW, Kirka K. (2013).  $Na^{+}$  extrusion imposes an acid load on the intraerythrocytic malaria parasite. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **189**: 1– 4.
- Staiger C, Hinneburg A, Klösigen RB. (2009). Diversity in degrees of freedom of mitochondrial transit peptides. *Molecular Biology and Evolution*, **26**:1773-1780.
- Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, Clark CG, Roger AJ. (2008). Organelles in *Blastocystis* that Blur the Distinction between Mitochondria and Hydrogenosomes. *Current biology*, **18**(8): 580–585.
- Stelly N, Mauger JP, Claret M, Adoutte A. (1991). Cortical alveoli of *Paramecium*: a vast submembranous calcium storage compartment. *Journal of Cell Biology*, **113**(1):103-112.
- Stelly N, Halpern S, Nicolas G, Fragu P, Adoutte A. (1995). Direct visualization of a vast cortical calcium compartment in *Paramecium* by secondary ion mass spectrometry (SIMS) microscopy: possible involvement in exocytosis. *Journal of Cell Science*, **108**:1895-1909.
- Sterud E, Hansen MK, Mo TA. (2000) .Systemic infection with *Uronema*-like ciliates in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) *Journal of Fish Diseases*, **23**: 33–37.
- Stidworthy MF, Garner MM, Bradway DS, Westfall BD, Joseph B, Repetto S, Guglielmi E, Schmidt-Posthaus H, Thornton SM. (2014). Nondomestic, Exotic, Wildlife and Zoo Animals Systemic Scuticociliatosis (*Philasterides dicentrarchi*) in Sharks. *Veterinary Pathology*, **51**: 628-663.
- Stock C, Grønlien HK, Allen RD. (2002). The ionic composition of the contractile vacuole fluid of *Paramecium* mirrors ion transport across the plasma membrane. *European Journal of cellular Biology*, **81**(9):505-515.

- Stoppani AO, Docampo R, de Boiso JF, Frasch AC. (1980). Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **2**(1):3-21.
- Strippoli V1, Dauria FD, Tecca M, Callari A, Simonetti G. (2000). Propyl gallate increases *in vitro* antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **16**(1):73-76.
- Sudhandiran G, Shaha C. (2003). Antimonial-induced increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, **4**;278(27):25120-32.
- Sun HY, Zhu XQ, Xie MQ, Wu XY, Li AX, Lin RQ, Song HQ. (2006). Characterization of *Cryptocaryon irritans* isolates from marine fishes in Mainland China by ITS ribosomal DNA sequences. *Parasitology Research*, **99**(2):160-6.
- Suski JM, Lebieczinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. (2012) Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods in Molecular Biology*, **810**:183-205.
- Suzuki Y, Yasunaga T, Ohkura R, Wakabayashi T, Sutoh K. (1998). Swing of the lever arm of a myosin motor at the isomerization and phosphate-release steps. *Nature*, **396**: 380-383.
- Suzuki T, Hashimoto T, Yabu Y, Kido Y, Sakamoto K, Nihei C, Hato M, Suzuki S, Amano Y, Nagai K, Hosokawa T, Minagawa N, Ohta N, Kita K. (2004). Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *Biochemical et Biophysical Research Communications*, **313**:1044–1052.
- Symersky J1, Osowski D, Walters DE, Mueller DM. (2012). Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Science, U S A*, **28**;109(35):13961-13965.
- Szabo CM, Oldfield E. (2001). An investigation of bisphosphonate inhibition of a vacuolar proton-pumping pyrophosphatase. *Biochemical et Biophysical Research Communication*, **287**: 468-473.
- Szala B, Jolivet Y, Hasenfratz MP, Dizengremel P, Rychter AM. (2003). Oxygen concentration regulates alternative oxidase expression in barley roots during hypoxia and post-hypoxia. *Physiologia Plantarum*, **119**:494–502.
- Szajnman SH, Montalvetti A, Wang Y, Docampo R, Rodriguez JB. (2003). Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of

- Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**:3231-3235.
- Szajman SH, Rosso VS, Malayil L, Smith A, Moreno SN, Docampo R, Rodriguez JB. (2012). 1-(Fluoroalkylidene)-1,1-bisphosphonic acids are potent and selective inhibitors of the enzymatic activity of *Toxoplasma gondii* farnesyl pyrophosphate synthase. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **10**:1424-1433.
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews*, **79**(4):1089-1125.
- Takagishi N1, Yoshinaga T, Ogawa K. (2009). Effect of hyposalinity on the infection and pathogenicity of *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **86**(2):175-179.
- Takasu A, Nakanishi Y, Yamauchi T, Maeshima M. (1997). Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. *Journal of Biochemistry*, **122**:883-889.
- Tamura H, Mizutani A, Yukioka H, Miki N, Ohba H, (1999). Effect of the methoxyiminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 55: 681–686.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **12**:2725-2729.
- Tanabe K, Zakeri S, Palacpac NM, Afshar M, Randrianarivelojosia M, Kaneko A, Marma AS, Horii T, Mita T. (2011). Spontaneous mutations in the *Plasmodium falciparum* sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PfATP6) gene among geographically widespread parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy*, **55**(1):94-100.
- Theodorou ME, Plaxton WC. (1993). Metabolic Adaptations of Plant Respiration to Nutritional Phosphate Deprivation. *Plant Physiology*, **101**: 339-344.
- Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI. (2006). N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **150**: 192-200.
- Torrentino-Madamet M, Desplans J, Travaillé C, James Y, Parzy D. (2010). Microaerophilic respiratory metabolism of *Plasmodium*

- falciparum* mitochondrion as a drug target. *Current Molecular Medicine*, **10**: 29–46.
- Tripathy S, Das S, Chakraborty SP, Sahu SK, Pramanik P, Roy S. (2012). Synthesis, characterization of chitosan-tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its *in vivo* anti-malarial efficacy against rodent parasite: a dose and duration dependent approach. *International Journal of Pharmacology*, **15**;434(1-2):292-305.
- Umbach AL, Siedow JN. (1993). Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiology*, **103**:845–854.
- Umbach AL, Siedow JN. (2000). The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **378**(2):234-245.
- Umehara A, Kosuga Y, Hirose H. (2003). Scuticociliata infection in the weedy sea dragon *Phyllopteryx taeniolatus*. *Parasitology International*, **52**(2):165-168.
- Urbina JA, Moreno B, Vierkotter S, Oldfield E, Payares G, Sanoja C, Bailey BN, Yan W, Scott DA, Moreno SN, Docampo R. (1999). *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *Journal of Biological Chemistry*, **19**;274(47):33609-33615.
- Urrutxurtua I, Orive e, de la Sota A. (2003). Seasonal dynamics of ciliated protozoa and their potential food in an eutrophic estuary (Bay of Biscay). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **57**:1169–1182.
- Uyemura SA, Luo S, Moreno SN, Docampo R. (2000). Oxidative phosphorylation,  $\text{Ca}^{2+}$  transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(13):9709-97015.
- Van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S. (1999). Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical et Biophysical Research Communications*, **255**: 491-494.
- Van Der Heyden N, Docampo R. (2002). Proton and sodium pumps regulate the plasma membrane potential of different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **120**:127–139.



- Van Hellemond JJ1, Opperdoes FR, Tielens AG. (2005). The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society Transactions*, **33**(5):967-971.
- Vanlerberghe, G.C.; McIntosh, L (1994) Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression: Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiology*, 1994, **105**: 867–874.
- Vanlerberghe GC, McIntosh L. (1997). Alternative oxidase: from gene to function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 703–734.
- Vanlerberghe GC. (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Science*, **14**: 6805-6847.
- Venter M, Gronewald J-H, Botha FC. (2006). Sequence analysis and transcriptional profiling of two vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase isoforms in *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Research*, **119**: 469-478.
- Vercesi AE, Docampo R. (1996). Sodium proton exchange stimulates Ca<sup>2+</sup> release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochemical journal*, **315**(Pt 1):265-270.
- Vercesi AE, Rodrigues CO, Catisti R, Docampo R. (2000). Presence of a Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Letters*, **473**(2):203-6.
- Verner Z, Cermáková P, Skodová I, Kováčová B, Lukeš J, Horváth A. (2014). Comparative analysis of respiratory chain and oxidative phosphorylation in *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens* and procyclic stage of *Trypanosoma brucei*. *Molecular Biochemistry and Parasitology*, **193**(1):55-65.
- Von Brand T. (1973). Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa en *Biochemistry of Parasites*, Theodor Von Brand. Academic Press INC, Londres.
- Wagner AM, Krab K, Wagner MJ, Moore AL. (2008). Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochemical et Biophys Acta*, **1777**: 993–1000.
- Walker Jr.R, Saha L, Hill GC, Chaudhuri M. (2005). The effect of over-expression of the alternative oxidase in the procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **139**:153–162.



- Wang Y, Miao M, Zhang Q, Gao S, Song W, Al-Rasheid KAS, Warren A, Ma H. (2008). Three marine interstitial scuticociliates, *Schizocalyptra similis* sp. n., *S. sínica* sp. n. and *Hippocomos salinus* Small and Lynn, 1985 (Ciliophora: Scuticociliatida), isolated from chinese coastal waters. *Acta Protozoologica*, **47**: 377–387.
- Wang Y, Jin S, Wang M, Zhu L, Zhang X. (2013). Isolation and characterization of a conserved domain in the eremophyte H<sup>+</sup>-PPase family. *Plos One*, **8**: e70099.
- Wassmer T, Froissard M, Plattner H, Kissmehl R, Cohen J. (2005). The vacuolar proton-ATPase plays a major role in several membrane-bounded organelles in *Paramecium*. *Journal of Cellular Science*, **118**(Pt 13):2813-2825.
- Williams BAP, Elliot C, Burri L, Kido Y, Kita K, Moore AL, Keeling PJ. (2010). A broad distribution of the alternative oxidase in microsporidian parasites. *Plos Pathogens* **6**: e1000761.
- Williamson CL, Dabkowski ER, Dillmann WH, Hollander JM. (2008). Mitochondria protection from hypoxia/reoxygenation injury with mitochondria heat shock protein 70 over-expression. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **294**: H249–H256.
- Woo PTK. (1987). Immune response of fish to parasitic protozoa. *Trends in Parasitology*, **3**:186–188.
- Woyda-Ploszczyca A, Sluse FE, Jarmuskiewicz W. (2009). Regulation of *Acanthamoeba castellanii* alternative oxidase activity by mutual exclusion of purine nucleotides; ATP's inhibitory effect. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1787**: 264-271.
- Woyda-Ploszczyca A, Koziel A, Antos-Krzeminska N, Jarmuskiewicz W (2011) Impact of oxidative stress on *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial bioenergetics depends on cell growth stage. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **43**: 217-225.
- Wright MV, Van Houten JL. (1990). Characterization of a putative Ca<sup>2(+)</sup>-transporting Ca<sup>2(+)</sup>-ATPase in the pellicles of *Paramecium tetraurelia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **116**:1029(2):241-251.
- Wünsch S, Sanchez CP, Gekle M, Große-Wortmann L, Wiesner J, Lanzer M. (1998). Differential Stimulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Determines Chloroquine Uptake in *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Cell Biology*, **140**(2): 335–345.

- Xie Y, Chen S, Yan Y, Zhang Z, Li D, Yu H, Wang C, Nong X, Zhou X, Gu X, Wang S, Peng X, Yang G. (2013). Potential of recombinant inorganic pyrophosphatase antigen as a new vaccine candidate against *Baylisascaris schroederi* in mice. *Veterinary Research*, **3**;44:90.
- Xu T, Yao F, Liang WS, Li YH, Li DR, Wang H, Wang ZY. (2012). Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and resistance to oxidative stress of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Microbiology*, **50**:594–602.
- Xu T, Pagadala V, Mueller DM. (2015). Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. *Microbial Cell*, **2**(4):105-125.
- Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, Blumwald E. (2005) .Vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a  $\text{Ca}^{2+}$ - and pH-dependent manner. *Proceedings in National Academy of Science U S A*, **1**;102(44):16107-16112.
- Yoshinaga T, Nakazoe J. (1993). Isolation and *in vitro* cultivation of an unidentified ciliate causing scuticocilicosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gyobyo Kenkyu*, **28**: 131–134.
- Young PG. (1983). The SHAM-sensitive alternative oxidase in *Tetrahymena pyriformis*: Activity as a function of growth state and chloramphenicol treatment. *Journal of Genetical Microbiology*, **129**: 1357-1363.
- Young IS, Woodside JV. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54**:176–186.
- Young ND, Crosbie PB, Adams MB, Nowak BF, Morrison RN. (2007). *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Parasitology*, **37**(13):1469-1481.
- Yukioka H, Inagaki S, Tanaka R, Katoh K, Miki N, Mizutani A, Masuko M. (1998). Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochimical et Biophysical Acta*, **1442**: 161–169.
- Zdobnov EM, Apweiler R. (2001). InterProScan- An integration platform for the signature recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, **17**: 847-848.
- Zhang LT, Zhang ZS, Gao HY, Xue ZC, Yang C, Meng XL, Meng QW. (2011). Mitochondrial alternative oxidase pathway protects plants against photoinhibition by alleviating inhibition of the repair of photodamaged PSII through preventing formation of reactive oxygen species in *Rumex K-1* leaves. *Physiologia Plantarum*, **143**:396–407.

- Zhen RG, Baykov AA, Bakuleva NP, Rea PA. (1994). Aminomethylenediphosphonate: a potent type-specific inhibitor of both plant and phototrophic bacterial  $H^+$ -pyrophosphatases. *Plant Physiology*, **104**:153-159.
- Zhen RG, Kim EJ, Rea P. (1997). The molecular and biochemical basis of pyrophosphatase energized proton translocation at the vacuolar membrane. *Advances in Botanical Research*, **25**: 297-337.
- Zheng J, Ramirez VD. (2000). Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *British Journal of Pharmacology*, **130**(5):1115-11123.
- Zini R, Morin C, Bertelli AA, Tillement JP. (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research* **25**: 87-97.
- Zurita JL, Jos A, del Peso A, Salguero M, López-Artíguez M, Repetto G. (2007). Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems. *Journal of Water Research*, **41**(12):2599-2611.
- [Sin autores]. (2006). Información sobre el rodaballo y su cultivo. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). En: <http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Rodaballo.pdf>
- [Sin autores]. (2007). Final report on the amended safety assessment of Propyl Gallate. *International Journal of Toxicology*, 26 Suppl **3**:89-118.
- [Sin autores]. (2008). Real Decreto 1614/2008, de 3 de octubre, relativo a los requisitos zosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, así como a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. En: <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2008-16090>.
- [Sin autores]. (2012). Eurostat, Cultivo de rodaballo en Europa, Comisión Europea, 2012. En: [http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheets-aquaculture-species/turbot\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/factsheets-aquaculture-species/turbot_es.pdf)
- [Sin autores]. (2014). Informe La Acuicultura en España 2014, Asociación Empresarial de Productores de Cultivos marinos en España (A.P.R.O.M.A.R.). En: <http://www.apromar.es/content/la-acuicultura-en-espa%C3%B1a-2014>

- [Sin autores]. (2014). European Aquaculture report, 2004-2013. European Aquaculture report 2004-2013. European aquaculture production industry (Feap 2014). En: <http://www.feap.info/Default.asp?SHORTCUT=582>
- [Sin autores]. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (F.A.O.). En: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>

